

Aus der Klinik für Neurologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Lars Timmermann

des Fachbereichs Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

---

Physiologische und diagnostische Relevanz der  
N-Glykosylierung natürlich vorkommender  
Autoantikörper gegen das Beta-Amyloid Peptid bei der  
Alzheimer-Krankheit

---

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Yannick Kronimus**  
aus Dernbach

Marburg an der Lahn, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: **25.07.2019**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. Helmut Schäfer

**Referent:** Prof. Dr. med. Richard Dodel

**Korreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Schütz

---

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons  
Namensnennung  
Keine kommerzielle Nutzung  
Keine Bearbeitung  
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

---

*Meiner Familie,*

*meinen Freunden,*

*in besonderem Maße Kerstin!*

*„Ich habe nicht versagt. Ich habe nur 10000 Wege gefunden, die nicht funktionieren.“*

Thomas A. Edison



---

## Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	I
TABELLENVERZEICHNIS.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Alzheimer-Krankheit.....	1
1.1.1 Pathologie und Diagnostik .....	3
1.1.2 Therapeutische Maßnahmen.....	6
1.2 A $\beta$ <sub>42</sub> und die Amyloid-Kaskaden-Hypothese .....	8
1.2.1 A $\beta$ <sub>42</sub> -Oligomere.....	11
1.3 Immunglobulin G und die Alzheimer-Krankheit.....	13
1.4 Natürlich vorkommende Autoantikörper.....	18
1.4.1 Physiologische Relevanz von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> für die Alzheimer-Krankheit.....	20
1.4.2 N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> : Ansatzpunkt therapeutischer und diagnostischer Strategien? .....	22
1.5 Zielsetzung.....	27
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
2.1 Material .....	28
2.1.1 Chemikalien .....	28
2.1.2 Polypeptide und Organismen.....	30
2.1.3 Labormaterialien .....	31
2.1.4 Geräte.....	32
2.1.5 Software .....	34
2.2 Patienten .....	34
2.3 Proteinbiochemische Methoden .....	36
2.3.1 Aufreinigung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> .....	36
2.3.1.1 Aufbau der Affinitätssäulen.....	36
2.3.1.2 Affinitätschromatographie .....	36
2.3.1.3 Umpuffern/Entsalzen und Ankonzentrieren von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> .....	38
2.3.2 Deglykosylierung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> .....	38
2.3.3 Quantitative Proteinbestimmung .....	38
2.3.4 Herstellung von A $\beta$ <sub>42</sub> -Monomeren und -Oligomeren .....	39

---

2.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	40
2.3.5.1 A $\beta$ <sub>42</sub> ELISA .....	40
2.3.5.2 Rezeptor ELISA .....	41
2.3.5.3 C1q ELISA.....	42
2.3.5.4 Concanavalin-A ELISA .....	43
2.3.5.5 Zytokin ELISA .....	43
2.3.6 Surface Plasmon Resonance (SPR) Spektroskopie .....	44
2.3.7 A $\beta$ <sub>42</sub> -Aggregation .....	45
2.4 Zellbiologische Methoden .....	47
2.4.1 Zellkultur.....	47
2.4.2 A $\beta$ <sub>42</sub> -Phagozytose .....	48
2.4.3 A $\beta$ <sub>42</sub> -Toxizität.....	50
2.5 Glykoanalytik .....	52
2.5.1 Fc-F(ab) <sub>2</sub> -Präparation und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ....	52
2.5.2 Entfärbung, Reduktion, Alkylierung .....	53
2.5.3 In-Gel Verdau und Glykan-Extraktion.....	54
2.5.4 Permethylierung.....	54
2.5.5 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie.....	57
2.6 Weitere Methoden .....	59
2.6.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	59
2.6.2 Nephelometrie .....	59
2.7 Statistik.....	60
3. ERGEBNISSE .....	61
3.1 Grundlegende Vorversuche .....	61
3.2 Glykosylierungsmuster der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> .....	65
3.3 Funktioneller Einfluss der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> Glykosylierung .....	73
3.3.1 Antigenbindung und Aggregation .....	73
3.3.2 Bindung an Effektorstrukturen .....	79
3.3.3 Phagozytose .....	85
3.3.4 Zellviabilität .....	87
3.4 Fc N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit .....	93
3.4.1 Regressionsmodell zur Identifikation von Alzheimer-Patienten .....	107
4. DISKUSSION .....	110
4.1 Muster und funktioneller Einfluss der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> Glykosylierung.....	112
4.2 Fc N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit .....	124
4.3 Schlussfolgerung und Ausblick.....	130

---

5. ZUSAMMENFASSUNG .....	135
5.1 Summary .....	136
6. REFERENZEN .....	137
7. ANHANG .....	162
7.1 Weitere Statistik und Experimente .....	162
7.1.1 Statistische Auswertung der N-Glykosylierung von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> .....	162
7.1.2 Geschlechtsbezogene Auswertung der Patientenstudie .....	165
7.1.3 Altersbezogene Auswertung der Patientenstudie .....	174
7.2.3 Korrelationsanalysen .....	183
7.2.4 Regressionswerte Patientenstudie .....	186
7.2 Dokumente der Patientenstudie .....	187
7.3 Publikationen .....	199
7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen .....	200
7.5 Danksagung .....	201

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1.1	Neuropathologische Ausbreitung der Alzheimer-Krankheit	6
1.2	APP-Prozessierung	9
1.3	Sequenz und Struktur von A $\beta$ <sub>42</sub>	11
1.4	IgG Struktur	15
1.5	Potentieller Wirkmechanismus therapeutischer A $\beta$ <sub>42</sub> -Antikörper	17
1.6	IgG Glykosylierung	24
1.7	Funktionelle Bedeutung der Fc N-Glykosylierung von IgG	26
2.1	Aufreinigung von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>	37
2.2	Angewandte ELISA-Verfahren	40
2.3	Prinzip SPR Spektroskopie	45
2.4	Prinzip des Aggregations-Assays	46
2.5	Prinzip der Durchflusszytometrie	49
2.6	Prinzip CellTiter-Glo	51
2.7	Monosaccharide und der Prozess der Permethylierung	56
2.8	MALDI-TOF Massenspektrometrie	58
3.1	Überprüfung der spezifischen Aufreinigung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>	61
3.2	Massenspektrum der N-Glykosylierung vor und nach PNGase Be- handlung	63
3.3	Auswirkungen der Deglykosylierung auf die ConA Bindung	64
3.4	Aggregation von A $\beta$ <sub>42</sub>	65
3.5	Fc N-Glykosylierungsmuster von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>	67
3.6	Fab N-Glykosylierungsmuster von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>	69
3.7	ELISA-vermittelte Bindungsanalysen an A $\beta$ <sub>42</sub>	74
3.8	Bindungsanalysen an A $\beta$ <sub>42</sub> mittels SPR	77
3.9	Inhibition der A $\beta$ <sub>42</sub> -Aggregation	79
3.10	ELISA-vermittelte Bindungsanalysen an Fc $\gamma$ R	81
3.11	ELISA-vermittelte Bindungsanalysen an C1q und DC-SIGN	83
3.12	IgG-Subtypenbestimmung mittels Nephelometrie	84

3.13	Phagozytose von A $\beta$ <sub>42</sub> -Monomeren und -Oligomeren	86
3.14	Zellviabilität nach Behandlung mit A $\beta$ <sub>42</sub> -Monomeren	88
3.15	Zellviabilität nach Behandlung mit A $\beta$ <sub>42</sub> -Oligomeren	90
3.16	Zytokin-Sekretion nach BV2 Behandlung	92
3.17	Fc N-Glykosylierungsmuster von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	95
3.18	Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	101
3.19	Korrelationsanalysen der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> -assoziierten Fc N-Glykosylierung bei Alzheimer-Patienten	104
3.20	Korrelationsanalysen der IgG-assoziierten Fc N-Glykosylierung bei Alzheimer-Patienten	106
3.21	Regressionsmodell zur Identifikation von Alzheimer-Patienten	108
4.1	Veränderter Wirkmechanismus von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> nach Deglykosylierung	132
A1	Geschlechtsbezogene Fc N-Glykosylierungsmuster von IgG bei der Alzheimer-Krankheit	165
A2	Geschlechtsbezogene Fc N-Glykosylierungsmuster von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	166
A3	Geschlechtsbezogener Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG bei der Alzheimer-Krankheit	170
A4	Geschlechtsbezogener Zusammenschluss der Fc N-Glykane von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	171
A5	Altersbezogene Fc N-Glykosylierungsmuster von IgG bei der Alzheimer-Krankheit	174
A6	Altersbezogene Fc N-Glykosylierungsmuster von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	175
A7	Altersbezogener Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG bei der Alzheimer-Krankheit	179
A8	Altersbezogener Zusammenschluss der Fc N-Glykane von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	180
A9	Korrelationsanalysen der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> -assoziierten Fc N-Glykosylierung bei Kontrollprobanden	183
A10	Nach der Regressionsformel berechnete Werte zur Unterscheidung von Kontrollprobanden und Alzheimer-Patienten	186

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
2.1	Verwendete Chemikalien samt Hersteller/Lieferant	28
2.2	Verwendete Peptide, Proteine, Antikörper und Enzyme samt Hersteller/Lieferant	30
2.3	Verwendete Labormaterialien samt Hersteller/Lieferant	31
2.4	Verwendete Geräte samt Hersteller/Lieferant	32
2.5	Verwendete Software samt Entwickler	34
2.6	Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie	35
2.7	Passagierung von HT-22 und BV2 Zellen	48
2.8	Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel	53
3.1	Relative Häufigkeiten der Fc- und Fab-assoziierten N-Glykane von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>	70
3.2	Relative Häufigkeiten der Fc- und Fab-assoziierten N-Glykane von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> nach Zusammenschluss hinsichtlich zusätzlich zur Kernstruktur enthaltener Zucker	72
3.3	KD-Werte und maximale RUs	76
3.4	Demographische Merkmale der Studienteilnehmer	93
3.5	Relative Häufigkeiten der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	96
3.6	Statistischer Vergleich der Fc N-Glykosylierung von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	98
3.7	Relative Häufigkeiten nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	102
3.8	Statistischer Vergleich nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	103
3.9	Fc N-Glykane des Regressionsmodells	109
4.1	Altersabhängige Veränderung der Fc N-Glykosylierung	128
A1	Statistischer Vergleich der Fab und Fc N-Glykosylierung von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>	162
A2	Geschlechtsbezogene relative Häufigkeiten der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	167
A3	Geschlechtsbezogener statistischer Vergleich der Fc N-Glykosylierung von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	169

---

A4	Geschlechtsbezogene relative Häufigkeiten nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	172
A5	Geschlechtsbezogener statistischer Vergleich nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	173
A6	Altersbezogene relative Häufigkeiten der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	176
A7	Altersbezogener statistischer Vergleich der Fc N-Glykosylierung von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	178
A8	Altersbezogene relative Häufigkeiten nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	181
A9	Altersbezogener statistischer Vergleich nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit	182
A10	Korrelationskoeffizienten und <i>p</i> -Werte	184

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AD	Alzheimer-Krankheit (englisch: Alzheimer's Disease)
ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (englisch: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
ADCP	Antikörper-abhängige zellvermittelte Phagozytose (englisch: antibody-dependent cellular phagocytosis)
aH <sub>2</sub> O	Wasser analyserein
AHC	Ammoniumhydrogencarbonat
APP	Amyloid Precursor Protein
Aβ <sub>40</sub>	Beta-Amyloid 1-40
Aβ <sub>42</sub>	Beta-Amyloid 1-42
b-GlcNAc	Antennen halbierendes (bisecting) N-Acetylglucosamin
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität (englisch: complement-dependent cytotoxicity)
CDP	Komplement-abhängige Phagozytose (englisch: complement-dependent phagocytosis)
CDR	Komplementarität bestimmende Region (englisch: complementarity determining region)
CH <sub>3</sub> I	Iodomethan
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin-A
CTR	Kontrollproband (englisch: control proband)
DC-SIGN	Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum



Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FCS	fetales Rinderserum (englisch: fetal calf serum)
FcγR	Fc-Gamma Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FT	Säulendurchfluss (englisch: Flow-Through)
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch: horseradish peroxidase)
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
IVIg	intravenöse Immunglobuline
mAb	monoklonaler Antikörper (englisch: monoclonal antibody)
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight
Man	Mannose
nAbs	natürlich vorkommende Autoantikörper (englisch: naturally occurring auto-antibodies)
NaCl	Natriumchlorid
Neu <sub>5</sub> Ac	N-Acetylneuraminsäure
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)
PNGase F	Peptid-N-Glycosidase F
PTM	posttranslationale Modifikation
PS-1/2	Präsenilin-1/2
rH <sub>2</sub> O	Reinstwasser

---

RT	Raumtemperatur
RU	Response Unit
SPR	Surface Plasmon Resonance
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
TFA	Trifluoressigsäure (englisch: trifluoroacetic acid)
ThT	Thioflavin T
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRIM21	Tripartite motif-containing protein 21
ü.N.	über Nacht
ZNS	Zentralnervensystem

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit stellt beim Menschen die häufigste neurodegenerative Erkrankung und mit einem Anteil von 60-80 % die mit Abstand häufigste Form der Demenz dar (Cunningham *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Religa *et al.*, 2015). Metaanalysen beziffern bei Europäern im Alter von über 50 Jahren die Prävalenz auf ca. 5 % und die jährliche Inzidenz auf ca. 1,1 %, wobei diese Zahlen im Zuge fortschreitenden Alters zunehmen. So wird in Europa die Anzahl der Patienten bei den 65- bis 74-Jährigen auf etwa 0,97 %, bei den über 85-Jährigen auf ca. 22,5 % geschätzt (Niu *et al.*, 2017). Darüber hinaus wird der Alzheimer-Krankheit in den kommenden Jahrzehnten aufgrund des zunehmenden demographischen Wandels der Gesellschaft eine noch größere Bedeutung zukommen. Während im Jahr 2013 ca. 7,5 Millionen Menschen in Europa betroffen waren, deuten Prognosen für das Jahr 2040 mit einer Anzahl von 13,1 Millionen Patienten auf eine deutlich gesteigerte Prävalenz hin (Tomaskova *et al.*, 2016).

Ätiologisch betrachtet unterscheidet man bei der Alzheimer-Krankheit zwischen der genetischen bzw. familiären (englisch: familial Alzheimer's Disease, fAD) und der sporadischen Krankheitsform (sporadic Alzheimer's Disease, sAD) (Lippa *et al.*, 1996). Die genetisch bedingte Alzheimer-Krankheit zeigt dabei einen in der Regel frühen Ausbruch vor dem 65. Lebensjahr (englisch: early onset Alzheimer's Disease, EOAD) und konnte bislang mit autosomal dominant vererbten Mutationen in drei Genen in Verbindung gebracht werden (Bird, 1998). Diese Gene codieren für die Proteine Amyloid Precursor Protein (APP) auf Chromosom 21, Präsenilin-1 (PS-1) auf Chromosom 14 sowie Präsenilin-2 (PS-2) auf Chromosom 1 (Lippa *et al.*, 1996; Bekris *et al.*, 2010). Während die physiologische Funktion von APP als ubiquitär exprimiertes Transmembranprotein weitgehend ungeklärt ist, jedoch unter anderem eine neuronale Beteiligung an der Synaptogenese und Signaltransduktion vermutet wird, konnten bereits diverse mit der Alzheimer-Krankheit assoziierte genetische Varianten identifiziert werden (Kowalska, 2003; Cassar and Kretzschmar, 2016; Coronel *et al.*, 2018). C-terminale Regionen des Proteins sind bei diesen Mutationen besonders häufig betroffen und verursachen aufgrund Veränderungen der APP-Prozessierung die vermehrte Bildung des aus 42 Aminosäuren bestehenden Peptids Beta-Amyloid (A $\beta$ <sub>42</sub>) (Sinha and Lieberburg, 1999; Karch *et al.*, 2014).

Der zugrundeliegende Mechanismus der APP-Prozessierung sowie die pathologische Bedeutung von A $\beta$ <sub>42</sub> soll in Kapitel 1.2 näher erläutert werden. Neben dem Vorläuferprotein selbst, können auch Mutationen von PS-1 und PS-2 die Prozessierung von APP und somit die Produktion von A $\beta$  beeinflussen (Larner, 2013; Cai *et al.*, 2015). Bei diesen Proteinen handelt es sich um Untereinheiten des Enzyms Gamma-Sekretase, welches für die Abspaltung der A $\beta$ -Domäne verantwortlich ist (Krishnaswamy *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2019).

Die üblicherweise zu einem späteren Zeitpunkt auftretende (englisch: late onset Alzheimer's Disease, LOAD), sporadische Alzheimer-Krankheit ist ebenfalls mit speziellen genetischen Varianten assoziiert. Diese wurden bislang jedoch ausschließlich als Risikofaktoren und nicht als Ursache der Erkrankung beschrieben (Piaceri *et al.*, 2013). Mutationen im Gen, welches für Apolipoprotein E codiert, stellen hierbei die größten Risikofaktoren dar und konnten bei heterozygoten Trägern mit einer dreifach und bei homozygoten Trägern mit einer zehnfach erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit in Verbindung gebracht werden (Liu *et al.*, 2013). Neben der genetischen Prädisposition sowie dem Alter als Hauptrisikofaktor zeigt sich eine Vielzahl weiterer Einflüsse für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit verantwortlich (Guerreiro and Bras, 2015). Gesundheitliche Aspekte, darunter die physische Verfassung samt Übergewicht, Rauchen und Erkrankungen wie Typ 2 Diabetes oder kardiovaskuläre Beschwerden konnten ebenso mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert werden, wie ein niedriger Bildungsstatus (Reitz and Mayeux, 2014; Crous-Bou *et al.*, 2017). Nichtsdestotrotz bleibt die kausale Pathogenese bei der sporadischen Alzheimer-Krankheit eine ungelöste Thematik, der die Neurowissenschaft bis heute nachgeht.

Das klinische Erscheinungsbild der in ca. 90-95 % aller Fälle vorliegenden sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit lässt sich hinsichtlich der Symptomatik nicht von der familiären Form unterscheiden (van der Flier and Scheltens, 2005; Bekris *et al.*, 2010; Reitz *et al.*, 2011). Lediglich der Krankheitsverlauf zeigt bei Letzterer eine in der Regel schnellere Progression (Piaceri *et al.*, 2013). Zu Beginn beider Krankheitsformen weisen betroffene Patienten eine milde Vergesslichkeit auf, welche zunächst keine allzu große Beeinträchtigung für das alltägliche Leben darstellt. Im Zuge der fortschreitenden Erkrankung entwickeln sich jedoch stärkere kognitive Defizite, darunter Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und der Exekutivfunktionen, Konfusion, Desorientierung und Persönlichkeitsveränderungen (Kumar and Tsao, 2019).

Die moderaten und schweren Stadien der Alzheimer-Krankheit sind schließlich durch Apathie, Agnosie, Aphasie und Apraxie gekennzeichnet (Tarawneh and Holtzman, 2012; Bature *et al.*, 2017). In Folge sekundärer Erkrankungen, darunter z.B. Infektionen, Pneumonien oder kardio-vaskuläre Erkrankungen, kommt es schließlich zum Tod der Patienten (Kukull *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 2003; Todd *et al.*, 2013).

Die mit der Alzheimer-Krankheit einhergehende Symptomatik fortgeschrittener Stadien führt bei betroffenen Patienten zu erheblichen Beeinträchtigungen im beruflichen und sozialen Alltag sowie im Endstadium der Erkrankung zu einer völligen Abhängigkeit von Pflege und Betreuung. Neben medizinischen Anforderungen rücken somit auch zunehmend versorgungswirtschaftliche Aspekte in den Vordergrund. Während sich die Kosten in Europa für die Versorgung und Therapie der Alzheimer-Krankheit im Jahre 2015 auf 232 Milliarden Euro beliefen, wird für das Jahr 2030 eine Steigerung auf 509 Milliarden und für das Jahr 2050 auf 825 Milliarden Euro prognostiziert (Cimler *et al.*, 2019).

### 1.1.1 Pathologie und Diagnostik

Die Alzheimer-Krankheit ist auf makroskopischer Ebene durch eine Hirnatrophie aufgrund eines fortschreitenden Verlustes von hauptsächlich corticalen Nervenzellen charakterisiert (Pini *et al.*, 2016). Dabei kommt es zu einer definierten Ausbreitung der Neurodegeneration, welche erstmals vom Anatomen Prof. Heiko Braak beschrieben und die entsprechenden Stadien nachträglich nach ihm benannt wurden (Abb. 1.1). Ausgehend vom entorhinalen Cortex der Temporallappen (Braak-Stadien 1 und 2) dehnt sich Pathologie über das limbische System samt Hippocampus (Braak-Stadien 3 und 4) auf neocorticale Hirnareale aus (Braak-Stadium 5) (Braak *et al.*, 2006). Der Untergang von Neuronen dieser betroffenen Gebiete korreliert dabei mit der Symptomatik zum jeweiligen Zeitpunkt der Erkrankung (Grothe *et al.*, 2017). Insbesondere kognitive Defizite wie Gedächtnisverlust und gestörte Exekutivfunktionen als Leitsymptome der Alzheimer-Krankheit lassen sich durch den Verlust hippocampaler und corticaler Nervenzellen begründen. Während beide Strukturen eine entscheidende Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung spielen, zeichnen sich corticale Hirnareale zusätzlich für höhere kognitive Funktionen verantwortlich (Lui *et al.*, 2011; Rusnakova *et al.*, 2011; Squire *et al.*, 2015).

Betrachtet man die der Alzheimer-Krankheit zugrundeliegenden neuropathologischen Vorgänge auf zellulärer Ebene, so lässt sich die Erkrankung vor allem durch die Ablagerung zweier Polypeptide/Proteine histopathologisch charakterisieren: A $\beta$  und Tau (Perl, 2010; Kumar *et al.*, 2015).

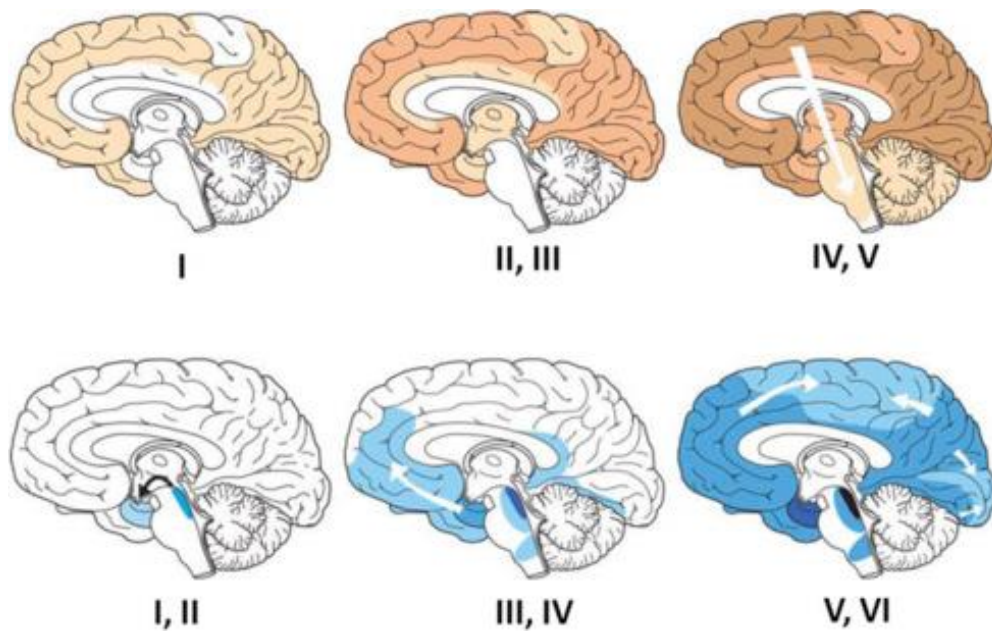
Neurone betroffener Hirnareale zeigen intrazellulär so genannte Neurofibrilläre Tangles (NFTs), welche aus aggregiertem sowie hyper- und abnormal phosphoryliertem Tau-Protein bestehen (Medeiros *et al.*, 2011; Chong *et al.*, 2018). Während durch alternatives Spleißen insgesamt sechs Tau-Isoformen im humanen Proteom existieren, sind es vor allem die 3R- und 4R-Isoform, welche den Hauptbestandteil der NFTs ausmachen (Goedert and Jakes, 1990; Gendreau and Hall, 2013). Diese weisen wiederum über 70 potentielle Phosphorylierungsstellen auf, wobei insbesondere das Anfügen von Phosphatresten an Serin-202 und Threonin-205 im Zuge der Alzheimer-Krankheit eine entscheidende Rolle spielt (Tenreiro *et al.*, 2014; Neddens *et al.*, 2018). Die abnormale Phosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau steht in direkter Verbindung mit neurodegenerativen Prozessen in Folge einer Destabilisierung des axonalen Zytoskeletts und stellt daher ein bedeutsames pathologisches Merkmal der Alzheimer-Krankheit dar (Busciglio *et al.*, 1995; Stancu *et al.*, 2014).

Neben intrazellulären NFTs lassen sich im Extrazellulärraum Proteinaggregate finden, welche 1906 erstmals von Alois Alzheimer entdeckt und als Senile oder Amyloid Plaques bezeichnet wurden (Alzheimer, 1907). Diese Plaques bestehen hauptsächlich aus dem zu unlöslichen Fibrillen aggregierten Peptid A $\beta$  und weisen eine zu den Braak-Stadien ähnliche cerebrale Ausbreitung auf (Religa *et al.*, 2003; Gouras *et al.*, 2015). Zunächst lassen sich die Ablagerungen in neocorticalen und entorhinalen Hirnregionen nachweisen, ehe das limbische System und final Hirnstammareale sowie das Kleinhirn betroffen sind (Abb. 1.1) (Jouanne *et al.*, 2017). Obwohl die Tau-Pathologie in der Regel stärker mit demenziellen Erkrankungen und kognitiven Defiziten korreliert, scheint dennoch bei der Alzheimer-Krankheit das Peptid A $\beta$  den kausalen Faktor der Neurodegeneration darzustellen (Nelson *et al.*, 2012).

Zusätzlich zu den bereits dargelegten pathologischen Hauptmerkmalen sind inflammatorische Prozesse, mitochondriale Dysfunktionen oder auch oxidativer Stress weitere Merkmale der Alzheimer-assoziierten Pathologie (Blennow *et al.*, 2006).

Die aktuelle Alzheimer-Diagnostik beruht auf den klinischen Diagnosekriterien nach NINCDS-ADRDA (McKhann *et al.*, 1984). Darüber hinaus wurden gemeinsame Leitlinien für klinische Standards durch die Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde, die Deutsche Gesellschaft für Neurologie sowie die Deutsche Alzheimer Gesellschaft veröffentlicht (Deuschl and Maier, 2016). Darauf basierend kommen im klinischen Alltag vor allem labordiagnostische, bildgebende sowie kognitive bzw. neuropsychologische Testverfahren zum Einsatz. Neben der Anamnese macht die Liquordiagnostik zur Titerbestimmung von A $\beta$  und Tau eine der Hauptsäulen bei der Identifikation von Alzheimer-Patienten aus. Speziell die Untersuchungen von A $\beta$ <sub>42</sub> und phosphoryliertem Tau Protein stehen dabei im Fokus und lassen durch eine verringerte Konzentration des Ersteren und eine erhöhte Konzentration des Letzteren auf eine vorliegende Alzheimer-Krankheit schließen (Lue *et al.*, 2017). Über das Konzentrationsverhältnis von Tau zu A $\beta$  kann die Erkrankung gegenüber anderen Demenzen sowie gesunden Probanden mit einer Sensitivität und Spezifität von bis zu 90 % abgegrenzt werden (Kapaki *et al.*, 2003; Ritchie *et al.*, 2017). Mithilfe bildgebender Verfahren, darunter Computertomographie, Magnetresonanztomographie und Positronen-Emissionstomographie, können zudem Strukturveränderungen wie die Hirnatrophie im Bereich des Hippocampus, des Gyrus parahippocampali und des Cortex abgeklärt sowie Amyloid Plaques quantifiziert werden (Vitali *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2012; Schilling *et al.*, 2016). Hierüber lässt sich die Alzheimer-Diagnose erhärten und darüber hinaus differentialdiagnostisch andere Grunderkrankungen oder Ursachen der Demenz ausschließen. Auch kognitive und neuropsychologische Tests spielen für die Beurteilung einer vorliegenden Demenz vom Alzheimer-Typ eine entscheidende Rolle. Der Mini-Mental-Status-Test (MMST) oder der DemTect sind nur zwei einer Vielzahl klinisch relevanter Testbatterien zur Einschätzung kognitiver Fähigkeiten bzw. Defizite (Cullen *et al.*, 2007; Deuschl and Maier, 2016). Für die neuropsychologische Diagnostik hat sich überdies der CERAD-Test (englisch: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) weitestgehend etabliert (Murayama and Saito, 2004; Deuschl and Maier, 2016).

Trotz der zahlreichen Verfahren kann die Alzheimer-Diagnose zu Lebzeiten nur als wahrscheinlich und erst *post mortem* durch histopathologische Untersuchungen eindeutig gestellt werden (Beach *et al.*, 2012).



**Abbildung 1.1. Neuropathologische Ausbreitung der Alzheimer-Krankheit.** Die Aggregation der Proteine Beta-Amyloid ( $A\beta$ ) und Tau wird für die Neurodegeneration bei Alzheimer-Patienten als ursächlich betrachtet. Neuropathologisch zeigt sich dies in der Bildung so genannter Amyloid Plaques ( $A\beta$ ) und Neurofibrillären Tangles (NFTs, Tau). Die Ausbreitung dieser  $A\beta$ - (gelb) und Tau-Pathologie (blau) läuft in verschiedenen Stadien ab, welche mit der Schwere der Erkrankung und den Symptomen korreliert. (Jouanne *et al.*, 2017)

### 1.1.2 Therapeutische Maßnahmen

Eine kausale Therapie ist für Alzheimer-Patienten zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht verfügbar, wodurch es sich um eine irreversible, unheilbare, neurodegenerative Erkrankung handelt (Neugroschl and Wang, 2011). Pharmakologische Maßnahmen zielen daher auf die Behandlung der Kernsymptomatik der Demenz sowie gegebenenfalls neuropsychologisch auftretender Begleitsymptome ab.

Der kognitive Verfall als ein Hauptsymptom der Alzheimer-Krankheit wird in der klinischen Praxis vor allem durch den Einsatz von Acetylcholinesterase-Hemmern sowie Antagonisten des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) medikamentös behandelt (Weller and Budson, 2018). Ziel beider Therapien ist die Modulation der Neurotransmission, wobei unterschiedliche Effekte getriggert werden. Acetylcholinesterase-Hemmer verlängern die Wirkdauer des neuronalen Botenstoffs Acetylcholin, indem die enzymatische Aktivität des verstoffwechselnden Enzyms herabgesetzt wird und der Neurotransmitter für eine längere Zeit im synaptischen Spalt verbleibt (Colovic *et al.*, 2013; Anand *et al.*, 2014).



Aufgrund einer gesteigerten synaptischen Transmission können so kognitiven Defiziten wie Gedächtnisstörungen in Folge der Neurodegeneration entgegengewirkt werden, unter anderem, da Nervenzellen des cholinergen Systems in hippocampale Regionen projizieren (Teles-Grilo Ruivo and Mellor, 2013; Maurer and Williams, 2017). Die Behandlung mit NMDA-Antagonisten beeinflusst hingegen das glutamaterge System und hat zum Ziel, die Aktivierung der entsprechenden NMDA-Rezeptoren (NMDAR) zu hemmen (Olivares *et al.*, 2012). Dadurch erfolgt die Regulation der dysregulierten, glutamatergen Neurotransmission, welche eine gewichtige Rolle bei der Alzheimer-assoziierten Pathologie einnimmt (Hynd *et al.*, 2004).

Neben den etablierten, wurde eine Reihe alternativer Medikamente ebenfalls hinsichtlich positiver Effekte bei der Behandlung von Alzheimer-Patienten getestet. Während die therapeutische Anwendung von Ginko Biloba einen positiven Kosten-Nutzen-Effekt aufweist und für die symptomatische Behandlung von demenziellen Syndromen zugelassen ist, wird die Anwendung von Vitamin E, nichtsteroidalen Antiphlogistika oder eine Hormonersatztherapie aufgrund gesteigerter Risiken von Nebenwirkungen nicht empfohlen (Deuschl and Maier, 2016).

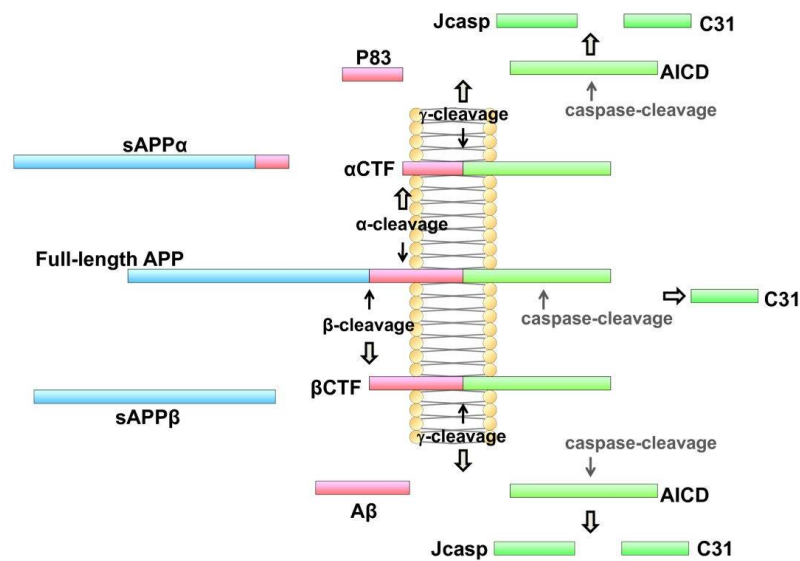
Genauso wie kognitive Defizite werden auch neuropsychologische Auffälligkeiten im Zuge der Alzheimer-Krankheit symptomatisch behandelt. Depressionen, Halluzinationen, Hyperaktivität bzw. gesteigerte Motorik, Angstzustände und Psychosen oder auch Schlaf- und Essstörungen treten nicht selten als Begleitsymptome der Erkrankung auf und lassen sich durch entsprechende pharmakologische Interventionen therapieren (Nowrangi *et al.*, 2015).

Prinzipiell sind bei der Behandlung von Alzheimer-Patienten aufgrund spezifischer Symptomkonstellationen die therapeutischen Maßnahmen von Fall zu Fall zu entscheiden. Das Ziel einer solchen Präzisionsmedizin ist es, auf den einzelnen Patienten zugeschnittene therapeutische Strategien aufzustellen, um das individuelle Ansprechen auf Art und Dosis verschiedener Medikamente oder klinischer Verfahren bestmöglich zu berücksichtigen (Gameiro *et al.*, 2018). Grundlage dieses Ansatzes sind die spezifischen genetischen und epigenetischen Voraussetzungen sowie Lebensumstände eines jeden Menschen, wodurch das klinische Erscheinungsbild im Einzelfall sehr unterschiedlich sein kann und dementsprechend auch eine individuelle Diagnostik angebracht ist (Ginsburg and Phillips, 2018).

## 1.2 A $\beta$ <sub>42</sub> und die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Wie bereits dargelegt, spielt das Peptid A $\beta$  und hier vor allem die aus 42 Aminosäuren bestehende Isoform (A $\beta$ <sub>42</sub>) als Hauptbestandteil der Amyloid Plaques eine entscheidende Rolle bei der Alzheimer-assoziierten Pathologie. Diesem negativen Bezug zum Trotz, konnten dem nativ ungefalteten Peptid auch eine Reihe physiologischer Funktionen nachgewiesen werden. Hierzu zählen unter anderem regulatorische Aufgaben bei der synaptischen Transmission sowie eine antimikrobielle oder auch genregulatorische Bedeutung (Parihar and Brewer, 2010; Brothers *et al.*, 2018).

Der Ursprung des A $\beta$ -Peptids liegt in der enzymatischen Proteolyse von APP. Dieses ubiquitär exprimierte Transmembranprotein ist in der Plasmamembran sowie den Membranen intrazellulärer Kompartimente lokalisiert und kann auf zwei verschiedene Arten prozessiert werden (Abb. 1.2) (Sakono and Zako, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Bei dem unter physiologischen Bedingungen verstärkt auftretenden, nicht-amyloidogenen Weg kommt es zunächst zur Spaltung von APP durch die Alpha-Sekretase, wodurch extrazellulär das Fragment sAPP $\alpha$  freigesetzt wird. Aufgrund der Schnittstelle innerhalb der A $\beta$ -Sequenz wird bereits hierdurch die Produktion des toxischen Agens der Alzheimer-Krankheit verhindert. In einem zweiten Schritt erfolgt anschließend die Spaltung des in der Membran verbleibenden  $\alpha$ CTF-Fragments durch die Gamma-Sekretase in P83 und AICD (Kojro and Fahrenholz, 2005). Die Freisetzung von A $\beta$  erfolgt hingegen über den amyloidogenen Weg. Hierbei wird APP oberhalb der A $\beta$ -Domäne durch die Beta-Sekretase geschnitten und das extrazelluläre Fragment sAPP $\beta$  sowie das membranständige Fragment  $\beta$ CTF generiert. Anschließend ist es erneut die Gamma-Sekretase, welche sich für den zweiten Prozessierungsschritt verantwortlich zeichnet und die Freisetzung von AICD und in diesem Fall A $\beta$  verursacht (Chow *et al.*, 2010).



**Abbildung 1.2. APP-Prozessierung.** Das Amyloid Precursor Protein (APP) findet sich ubiquitär in der Plasmamembran sowie in den Membranen von Zellkompartimenten wieder. In Ersterer ragt die Aβ-Domäne in den Extrazellulärraum, in Letzteren ins Cytoplasma der Zelle. APP kann in einem nicht amyloiden oder amyloiden Weg prozessiert werden. Der nicht-amyloide Weg umfasst die Aktivität der Alpha- und Gamma-Sekretase und bringt die Spaltprodukte sAPPα, P83 und AICD hervor. Demgegenüber steht der amyloide Weg, in welchem durch die Beta- und Gamma-Sekretase die Spaltprodukte sAPPβ, AICD sowie das Aβ-Peptid erzeugt werden. (Zhang *et al.*, 2011)

Die Gamma-Sekretase, welche neben PS-1 und PS-2 auch aus den Proteinuntereinheiten Nicastrin und APH-1 (englisch: anterior pharynx-defective 1) besteht, zeichnet sich durch eine enzymatische Aktivität mit variabler Schnittstelle innerhalb der Aminosäuresequenz von APP aus (Morishima-Kawashima, 2014). Auf diese Weise können Aβ-Isoformen mit einer Länge von 37 bis 43 Aminosäuren (Aβ<sub>xx</sub>) hervorgebracht werden, wobei Aβ<sub>42</sub> bzw. ein erhöhtes Verhältnis von Aβ<sub>42</sub> zu Aβ<sub>40</sub> mit einer progressiven Neurodegeneration bei der Alzheimer-Krankheit einhergeht (Klein *et al.*, 1999; Jan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Sengupta *et al.*, 2016). Entsprechend hierzu kann bei der familiären Alzheimer-Krankheit, wie bereits erläutert, durch Mutationen von APP oder Präsenilin, und bei der sporadischen Krankheitsform durch verschiedene Einflüsse, darunter expositionelle Risikofaktoren, aber auch Störungen des Säure-Base- oder Ionenhaushalts, eine Akkumulation von Aβ<sub>42</sub> beobachtet werden (Su and Chang, 2001; Vitvitsky *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017). Dabei steht vor allem das Ungleichgewicht zwischen Synthese und Beseitigung des Peptids im Vordergrund (Bateman *et al.*, 2006; Wildsmith *et al.*, 2013).

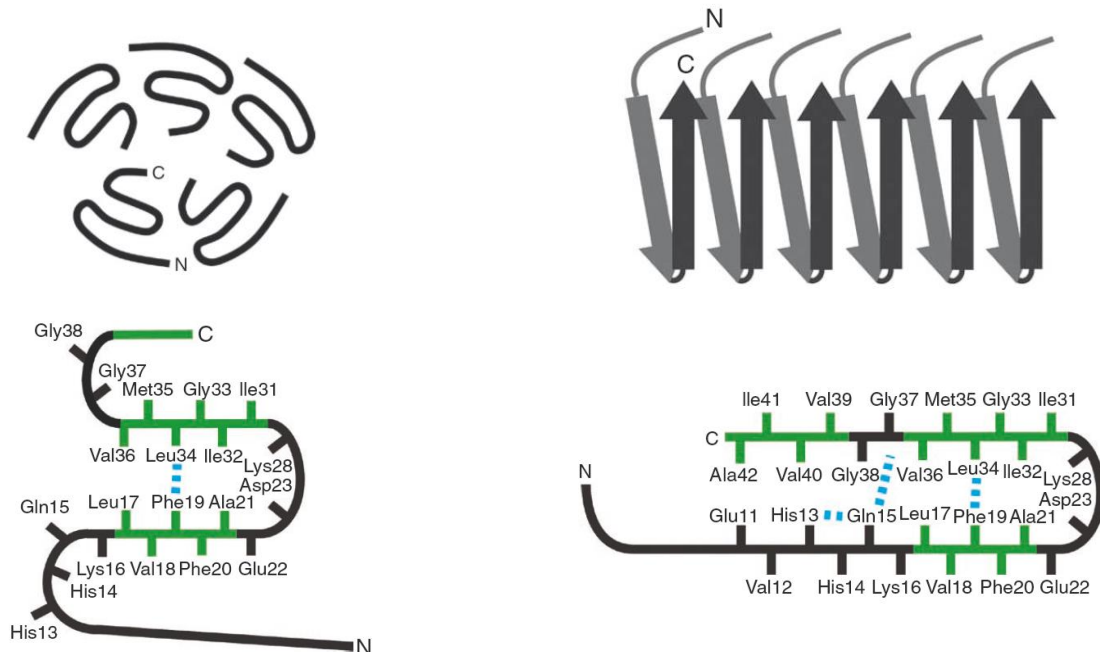
Die beiden zusätzlichen Aminosäuren, Isoleucin-41 und Alanin-42, führen darüber hinaus zu einer erhöhten Hydrophobizität des Peptids und verleihen diesem durch intra- und intermolekulare Bindungen verstärkte Aggregationseigenschaften (Abb. 1.3) (Ahmed *et al.*, 2010).

Es ist die Kombination aus einer gestörten A $\beta$ -Proteostase und den spezifischen Charakteristika von A $\beta_{42}$ , welche dem Peptid eine über die rein pathologische Assoziation hinausgehende Bedeutung bei der Alzheimer-Krankheit verschafft. Verschiedene Studien legen nahe, dass eine solche A $\beta_{42}$ -Pathologie vielmehr das initiale Ereignis der Erkrankung darstellt und sämtliche pathologischen Veränderungen als Folge dessen getriggert werden. Diese so genannte Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurde 1992 zum ersten Mal postuliert und findet unter leichten Adaptionen bis heute den größten Zuspruch in der Wissenschaft (Selkoe, 1991; Hardy and Higgins, 1992; Armstrong, 2011; Selkoe and Hardy, 2016). Demnach werden vor allem aggregierte A $\beta_{42}$ -Strukturen für die neurodegenerativen Prozessen im Zuge der Alzheimer-Krankheit hauptverantwortlich gemacht, da diesen weitreichende neuro- und zytotoxische Effekte nachgewiesen werden konnten, welche im nachfolgenden Kapitel eingehender behandelt werden (Koo *et al.*, 1999; Sadigh-Eteghad *et al.*, 2015). Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Zusammenhänge zwischen A $\beta_{42}$  und Leitsymptomen der Alzheimer-Krankheit präsent. So scheint das Peptid den Tau-Metabolismus zu beeinflussen und die verstärkte Bildung von NFTs hervorzurufen (Perez *et al.*, 2004; Reitz, 2012). Dabei steht vor allem die durch A $\beta_{42}$ -Aggregate induzierte, anormale Phosphorylierung von Tau im Fokus. Der dadurch bedingte Verlust der Mikrotubuli-Assoziation und somit die Destabilisierung vor allem des axonalen Zytoskeletts führt zu einer Störung der synaptischen Transmission und schlussendlich dem Untergang von Synapsen (Busciglio *et al.*, 1995; Stancu *et al.*, 2014). Zudem zeigen anormal phosphorylierte Tau-Proteine einen ähnlichen Polymerisationsmechanismus samt toxischer Aggregate wie das A $\beta$ -Peptid (Ward *et al.*, 2012; Guerrero-Munoz *et al.*, 2015). Neben direkten werden für A $\beta_{42}$  somit auch sekundär neurotoxische Effekte propagiert. Auch die neuronalen Entzündungsprozesse als ein Leitsymptom der Alzheimer-Krankheit sollen laut Amyloid-Kaskaden-Hypothese in der A $\beta_{42}$ -Pathologie ihren Ursprung haben. So induziert das Peptid die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren durch Aktivierung von Mikrogliazellen und begünstigt damit ein zytotoxisches, extrazelluläres Milieu (von Bernhardt *et al.*, 2010; Prinz *et al.*, 2011).

**A**

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVVIA

**B**



**Abbildung 1.3. Sequenz und Struktur von Aβ<sub>42</sub>.** **A.** Aminosäuresequenz von Aβ<sub>42</sub> im Einbuchstabencode: A = Alanin, D = Asparaginsäure, E = Glutaminsäure, F = Phenylalanin, G = Glycin, H = Histidin, I = Isoleucin, K = Lysin, L = Leucin, M = Methionin, N = Asparagin, Q = Glutamin, R = Arginin, S = Serin, V = Valin, Y = Tyrosin. **B.** Aβ<sub>42</sub>-Oligomere (links) stellen sich in der Regel als n-fache Penta- oder Hexamere dar, welche durch hydrophobe Wechselwirkungen der C-Termini von Aβ<sub>42</sub>-Monomeren entstehen. Dabei bilden die Monomere doppelte Haarnadelstrukturen aus. Molekularer Kontakt innerhalb der Moleküle besteht zwischen Phenylalanin-19 und Leucin-34 sowie zwischen Methionin-35 und Alanin-42. Aβ<sub>42</sub>-Fibrillen (rechts) lagern sich parallel zueinander an. Die Monomere bilden einfache Haarnadelstrukturen aus, wobei zwischen Phenylalanin-19 und Leucin-34 sowie Glutamin-15 und Glycin-37 intramolekulare Kontakte bestehen. Zusätzlich gehen Glutamin-15 und Glycin-37 intermolekulare Verbindungen ein. (Ahmed *et al.*, 2010)

### 1.2.1 Aβ<sub>42</sub>-Oligomere

Gemäß Amyloid-Kaskaden-Hypothese sind es aggregierte Strukturen von Aβ<sub>42</sub>, welche die Neurodegeneration als pathologische Hauptsymptomatik der Alzheimer-Krankheit verursachen. In Folge einer gesteigerten Produktion kommt es zunächst zur Akkumulation und aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften schließlich zur Aggregation des Peptids (Selkoe and Hardy, 2016). Über Jahrzehnte wurde dabei eine kontroverse Diskussion hinsichtlich der präzisen neuro- und zytotoxischen Aβ<sub>42</sub>-Strukturen geführt. Zunächst standen die Amyloid Plaques und somit fibrilläre Aβ<sub>42</sub>-Formen im Verdacht, die degenerativen Prozesse zu triggern.

Von dieser Hypothese wurde jedoch zunehmend Abstand genommen, unter anderem, da eine Korrelation zwischen der Belastung mit den unlöslichen Ablagerungen und dem kognitiven Verfall vielfach widerlegt werden konnte (Arriagada *et al.*, 1992; DaRocha-Souto *et al.*, 2011). Mittlerweile ist davon auszugehen, dass es kleinere lösliche A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere sowie protofibrilläre Strukturen sind, welche die Schädigung der Nervenzellen hervorrufen (Carrillo-Mora *et al.*, 2014; Aleksis *et al.*, 2017). Sowohl A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere als auch Protofibrillen können ringförmig oder linear vorliegen und unterscheiden sich voneinander in der Anzahl enthaltener Peptidmoleküle. Obwohl diesbezüglich eine stringente Unterscheidung nicht möglich ist, werden Aggregate ab einem Molekulargewicht von ca. 42 kDa in der Regel als Protofibrillen definiert (Rahimi *et al.*, 2008; Bruggink *et al.*, 2012). Ein entscheidender Unterschied zu fibrillärem A $\beta$ <sub>42</sub> stellt in beiden Fällen neben der Größe die antiparallele Anordnung der einzelnen A $\beta$ <sub>42</sub>-Moleküle dar, welche nicht selten als Voraussetzung für die Induktion neurotoxischer Effekte beschrieben wird (Cerf *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2014). So konnten *in vitro* und *in vivo* Experimente zeigen, dass präfibrilläre A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere, nicht aber unlösliche Fibrillen die Neurotoxizität auslösen (Lambert *et al.*, 1998; Hartley *et al.*, 1999).

Den durch A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere und Protofibrillen hervorgerufenen, schädlichen Effekten können sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Mechanismen zugrunde liegen (Gaspar *et al.*, 2010). Extrazellulär fungieren zahlreiche Rezeptoren auf der Oberfläche der Plasmamembran als direktes oder indirektes Ziel des aggregierten Peptids. Zu diesen zählen NMDAR, Neurotropher-Faktor-Rezeptoren oder Fas-Rezeptoren und können durch übermäßige Aktivierung zum neuronalen Zelltod führen. Dabei spielen intrazelluläre Signalkaskaden und Störungen der Calcium-Homöostase ebenso wie aktivitätsabhängige Apoptoseprogramme eine entscheidende Rolle (Ivins *et al.*, 1999; Morishima *et al.*, 2001; Texido *et al.*, 2011; Kaye and Lasagna-Reeves, 2013). Das Calcium-Signalling als weit verbreiteter, intrazellulärer Mechanismus zur Auslösung der Apoptose kommt zudem bei einer weiteren zytotoxischen Funktion von A $\beta$ <sub>42</sub>-Aggregaten zum Tragen (Hajnoczky *et al.*, 2003). Vor allem zirkuläre Oligomere sind in der Lage in die Plasmamembran zu interkalieren und Calcium-durchlässige Poren zu formen (Bode *et al.*, 2017).

Im Gegensatz zu extrazellulären, sind die durch A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere hervorgerufenen, intrazellulär stattfindenden, toxischen Prozesse weniger gut untersucht. Studien legen jedoch unter anderem eine A $\beta$ <sub>42</sub>-induzierte Störung des Proteasomkomplexes und damit sekundär erhöhte A $\beta$ - und Tau-Spiegel nahe (Tseng *et al.*, 2008). Darüber hinaus können A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere in Mitochondrien akkumulieren, wodurch intrazelluläre Stressreaktionen ausgelöst und reaktive Sauerstoffspezies vermehrt gebildet werden (Caspersen *et al.*, 2005; Reddy and Beal, 2008; Schilling and Eder, 2011). Auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) konnten Stressreaktionen und dadurch bedingte Caspase-abhängige Apoptoseprozesse durch die Akkumulation von A $\beta$ <sub>42</sub> aufgezeigt werden (Placido *et al.*, 2014).

### 1.3 Immunglobulin G und die Alzheimer-Krankheit

Unter anderem aufgrund fehlender kausaler Therapiemöglichkeiten, sind in den letzten Jahren Antikörper bzw. Immunglobuline der Klasse G (IgG) zunehmend in den Fokus der Alzheimer-Forschung gerückt. Das erhoffte therapeutische Potential beruht dabei auf einem umfangreichen und A $\beta$ <sub>42</sub>-gerichteten Wirkmechanismus mit der Möglichkeit einer gezielten Immunmodulation (Southwell and Patterson, 2010; Chowhan *et al.*, 2013).

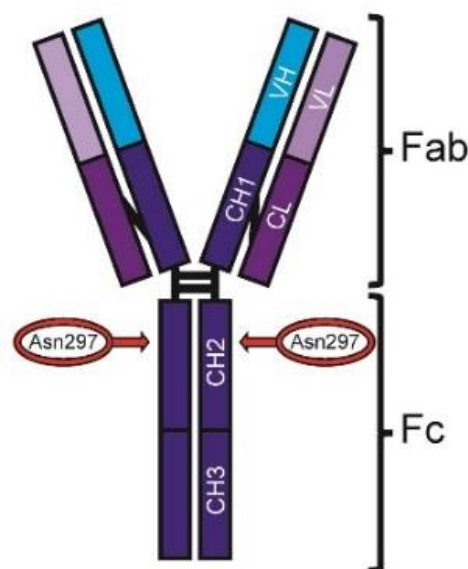
Immunglobuline G werden wie die meisten Antikörperklassen von Plasma- oder Gedächtnis-B-Zellen gebildet. Diesem Prozess geht in der Regel eine antigene und T-Zell-abhängige Stimulation von naiven B-Zellen voraus, welche daraufhin zu den beiden Zelltypen differenzieren können (Pieper *et al.*, 2013). Die in Folge dessen sezernierten IgG-Moleküle bestehen stets aus zwei identisch leichten und schweren Ketten, welche sich wiederum in konstante und variable Domänen gliedern (Abb. 1.4). Während sowohl die leichte als auch die schwere Kette je eine variable Domäne aufweisen, besteht die konstante Region der leichten Kette aus einer, die der schweren Kette aus drei identischen Domänen. Letztere können dabei vier verschiedene Phänotypen aufweisen, wodurch sich die IgG-Subtypen 1 bis 4 im humanen Antikörperpool ergeben (Schroeder and Cavacini, 2010). Neben der strukturellen, ist auch eine funktionelle Unterteilung von IgG in zwei Fragmente möglich: Fragment antigen binding (Fab) und Fragment crystallizable (Fc) (Abb. 1.4). Beide Fragmente stehen über die flexible Hinge-Region miteinander in Kontakt und übernehmen unterschiedliche immunologische Aufgaben (Schroeder and Cavacini, 2010; Liu and May, 2012).

Das Fab-Fragment erkennt und bindet komplementäre Strukturen des Antigens und kann bereits Neutralisations-Prozesse aufgrund sterischer Hinderungen induzieren. Insbesondere die Komplementarität bestimmenden Regionen (englisch: complementarity determining region, CDR) innerhalb der variablen Domänen beider Ketten sind an der spezifischen Antigenbindung beteiligt. Diese hypervariablen Sequenzen zeigen somatische Mutationen, welche im Zuge der Affinitätsreifung der korrespondierenden B-Zelle entstehen und nach positiver Selektion die Synthese maximal affiner IgG-Moleküle zum Ziel haben (Mishra and Mariuzza, 2018). Für die Antigenerkennung zeichnen sich dabei vornehmlich nicht-kovalente Bindungen, darunter elektrostatische Interaktionen, van der Waals Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich (Smith *et al.*, 1993; Forthal, 2014; Alexander *et al.*, 2015).

Die Bildung von Immunkomplexen ist darüber hinaus auch die Voraussetzung der Fc-Fragment-vermittelten Effektorfunktionen. Vor allem Fc-Gamma Rezeptoren (FcγR) in den Zellmembranen von Immunzellen sowie das hauptsächlich extrazellulär vorkommende, initiale Komplementprotein C1q machen die vorherrschenden Interaktionspartner von IgG aus, können in der Regel über das Fc-Fragment jedoch erst nach Opsonierung des Antigens effektiv gebunden werden. Verschiedene FcγR haben beispielsweise unterschiedliche Affinitäten zu den vier IgG-Subtypen und können – mit Ausnahme von FcγRI – erst nach multivalenten Interaktionen und dem Prozess des Rezeptor-Clusterings immunologische Kaskaden triggern (Duchemin *et al.*, 1994; Bruhns *et al.*, 2009; Hanson and Barb, 2015; Kiyoshi *et al.*, 2015; Robinett *et al.*, 2018). Bei diesen handelt es sich vornehmlich um Prozesse wie die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (englisch: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) oder die Antikörper-abhängige zellvermittelte Phagozytose (englisch: antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) (Nimmerjahn and Ravetch, 2008; Guilliams *et al.*, 2014; Vidarsson *et al.*, 2014). Auch C1q weist zu einzelnen IgG-Molekülen eine niedrige und aufgrund seiner sechs Bindedomänen erst zu multivalenten Immunkomplexen eine erhöhte Affinität auf (Kishore and Reid, 2000).



IgG3 und IgG1 werden dabei stark, IgG2 nur unter bestimmten Umständen und IgG4 gar nicht gebunden, sodass dementsprechend die Komplement-abhängige Zytotoxizität (englisch: complement-dependent cytotoxicity, CDC) sowie die Komplement-abhängige Phagozytose (englisch: complement-dependent phagocytosis, CDP) in Folge der Aktivierung von C1q unterschiedlich stark initiiert werden können (Noris and Remuzzi, 2013; Vidarsson *et al.*, 2014). Neben den herkömmlichen Rezeptoren existieren unter anderem zwei alternative Interaktionspartner für IgG, über deren exakte Bedeutung jedoch bis heute kontrovers diskutiert wird. Der Rezeptor dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin (DC-SIGN) findet sich hauptsächlich auf Makrophagen und verwandten Zellen des Immunsystems wieder und soll über eine Interleukin-vermittelte Signalkaskade antiinflammatorische Prozesse auslösen (Anthony *et al.*, 2012). Der zweite Bindepartner, tripartite motif-containing protein 21 (TRIM21), fungiert als cytosolischer Rezeptor und triggert die intrazelluläre Antikörper-vermittelte Proteolyse über den Proteasomkomplex. Diesem Mechanismus konnte vor allem bei Virusinfektionen eine bedeutende Rolle attestiert werden (McEwan *et al.*, 2011; Vaysburd *et al.*, 2013).



**Abbildung 1.4. IgG Struktur.** IgG-Moleküle bestehen aus zwei identisch leichten und schweren Ketten, wobei die leichten Ketten aus einer variablen (VL) und einer konstanten (CL), die schweren Ketten aus einer variablen (VH) und drei konstanten (CH1-3) Domänen aufgebaut sind. Darüber hinaus lassen sich IgG funktionell in zwei Fab- und ein Fc-Fragment(e) unterteilen, welche durch die flexible Hinge-Region miteinander verbunden sind. Am Fc-Fragment aller IgG finden sich an Asparagin-297 hochkonservierte N-Glykosylierungsstellen wieder. (Kronimus *et al.*, 2019)

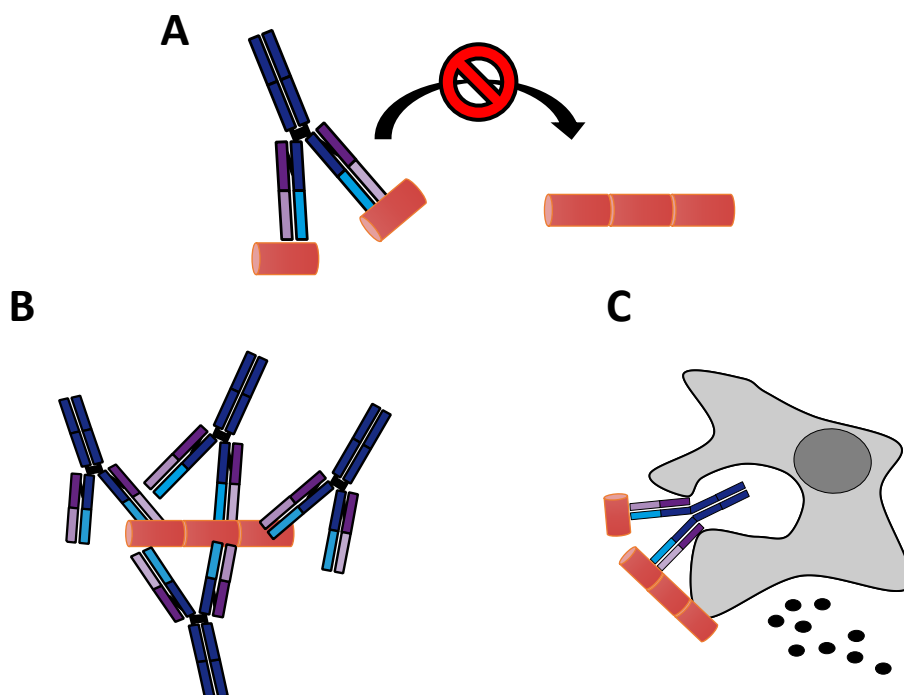
Es ist diesem umfassenden Wirkmechanismus zuzuschreiben, dass IgG häufig als therapeutische Option bei der Alzheimer-Krankheit in Betracht gezogen wurde. In der Theorie soll die Akkumulation und Aggregation von A $\beta$ <sub>42</sub> als das potentiell kausale Ereignis der Alzheimer-assoziierten Pathologie durch den Einsatz A $\beta$ <sub>42</sub>-spezifischer Antikörper reguliert und eingedämmt werden. Zum einen stützt sich dieser Ansatz auf eine spezifische Bindung des Peptids, wodurch die Neutralisation monomerer und oligomerer Strukturen herbeigeführt, der Aggregationsprozess inhibiert und dadurch neuroprotektive Prozesse ausgelöst werden. Zum anderen kann über A $\beta$ <sub>42</sub>-Antikörper und die Aktivierung mikroglialer Zellen – den Phagozyten des Zentralnervensystems (ZNS) – die Internalisierung und somit die Beseitigung der neurotoxischen Strukturen erreicht werden (Abb. 1.5) (Prins and Scheltens, 2013; Barrera-Ocampo and Lopera, 2016).

Sowohl passive als auch aktive Immunisierungsstrategien sind für einen solchen therapeutischen Ansatz prinzipiell denkbar und wurden bereits zahlreich durchgeführt. Die aktive Immunisierung verfolgt dabei das Ziel, durch antigene Stimulation von B-Zellen die körpereigene Produktion von A $\beta$ <sub>42</sub>-Antikörpern zu induzieren. Obgleich manche Studien eine geringfügige Verbesserung der Kognition innerhalb der Verumgruppe offenbarten, waren in diesen stets erhebliche Nebenwirkungen wie Meningoencephalitiden oder cerebrale Hämorrhagien zu beobachten und führten schließlich zum Abbruch der Tests (Barrera-Ocampo and Lopera, 2016).

Passive Immunisierungsstrategien setzen hingegen auf direkte Injektionen von zumeist humanisierten, monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen A $\beta$ <sub>42</sub>. In den letzten Jahren wurden zahlreiche solcher Antikörper vom IgG Typ getestet, wobei Stand heute keine der Studien die klinische Phase 3 vielversprechend abschließen konnte. Bapineuzumab, ein N-terminal bindender mAb gegen A $\beta$ <sub>42</sub>, war dabei der erste klinisch untersuchte Antikörper. Aufgrund ausbleibender kognitiver Verbesserungen sowie des Auftretens vasogener Ödeme in ca. 10 % aller Fälle wurde die klinische Studie beendet (Salloway *et al.*, 2009; Rinne *et al.*, 2010). Auf Bapineuzumab folgten unter anderem die mAbs Solanezumab und Gantenerumab. Auch hier war der fehlende positive Einfluss auf den kognitiven Verfall bei Alzheimer-Patienten ausschlaggebend für die Beendigung der Studien (Doody *et al.*, 2014; Ostrowitzki *et al.*, 2017; Honig *et al.*, 2018). Die Ergebnisse zweier aktuell noch laufender Phase-3 Studien mit Gantenerumab stehen dagegen noch aus (ClinicalTrials.gov: NCT01224106 und NCT02051608).

Ein weiterer therapeutischer Antikörper, Aducanumab, galt noch bis vor kurzem als der vielversprechendste Kandidat für eine effektive Antikörpertherapie bei der Alzheimer-Krankheit. Dem B-Zell-Pool gesunder Blutspender entspringend, handelt es sich in diesem Fall um einen humanen, monoklonalen Antikörper. Die klinische Phase-1 Studie offenbarte bei Patienten mit prodromaler und milder Alzheimer-Symptomatik zunächst eine gute Verträglichkeit sowie die Reduktion von Amyloid Plaques (Sevigny *et al.*, 2016). Nichtsdestotrotz wurden kürzlich die beiden klinischen Phase-3 Studien ENGAGE und EMERGE aufgrund nicht zu erreichender Ziele vorzeitig beendet, wobei die Studienergebnisse noch ausstehen (ClinicalTrials.gov: NCT02477800 und NCT02484547).

All diese Resultate belegen, dass der theoretische Ansatz einer Antikörper-basierten Therapie bei der Alzheimer-Krankheit für die praktische Umsetzung zahlreiche Hindernisse bereithält. Neben der Antigenspezifität und einer guten Verträglichkeit sind vermutlich noch weitere, unter anderem auch qualitative Faktoren zu berücksichtigen.



**Abbildung 1.5: Potentieller Wirkmechanismus therapeutischer Aβ<sub>42</sub>-Antikörper.** Die Akkumulation und Aggregation von Aβ<sub>42</sub> als neuropathologische Ursache der Alzheimer-Krankheit könnte durch den Wirkmechanismus spezifischer IgG eingedämmt werden. Dieser beinhaltet die Bindung und Neutralisation von Aβ<sub>42</sub>-Monomeren (A) und -Oligomeren (B), wodurch der Aggregationsprozess sowie die Zytotoxizität inhibiert werden. C. Darüber hinaus kann mithilfe von Aβ<sub>42</sub>-spezifischer IgG die Phagozytose der monomeren und oligomeren Strukturen induziert und über Aktivierung von Immunzellen die Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen moduliert werden. (Eigene Darstellung)

## 1.4 Natürlich vorkommende Autoantikörper

In Bezug auf die Antikörper-basierten therapeutischen Alzheimer-Studien und hier vor allem Aducanumab, ist es ein interessanter Fakt, dass im immunologischen Repertoire des Menschen bereits Antikörper der Klasse IgG vorhanden sind, welche gegen A $\beta$ <sub>42</sub> gerichtet sind. In diversen quantitativen Studien konnten solche sowohl im Liquor als auch im Serum gesunder und erkrankter Testpersonen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser vom pathologischen Status unabhängigen Existenz sowie ihrer autoreaktiven Eigenschaften werden sie dem Pool natürlich vorkommender Autoantikörper (englisch: naturally occurring autoantibodies, nAbs) zugeordnet (Du *et al.*, 2001; Hyman *et al.*, 2001; Britschgi *et al.*, 2009; Maftei *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2014).

Als Teil des angeborenen Immunsystems werden nAbs im Gegensatz zu herkömmlichen, von B2-Zellen synthetisierten Antikörpern von B1-Zellen produziert. Diese CD5-positive Zellpopulation entsteht im Zuge der B-Zell Entwicklung durch einen individuellen Entwicklungspfad und weist demnach einige Besonderheiten auf (Rothstein *et al.*, 2013). Ein grundsätzlicher Unterschied zu B2-Zellen besteht darin, dass Antikörper von B1-Zellen durch einen Antigen- und T-Zell-unabhängigen Prozess vom Kindesalter an zeitlebens sezerniert werden. Dadurch durchlaufen B1-Zellen auch nicht die Keimzentrumsreaktion, sodass sie keine Affinitätsreifung erfahren und nAbs folglich durch eine reduzierte Avidität und Spezifität zum Epitop und nicht selten eine Polyreaktivität gekennzeichnet sind (Ochsenbein and Zinkernagel, 2000; Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2006; Rothstein *et al.*, 2015). Obwohl es sich üblicherweise um Immunglobuline vom Typ M (IgM) oder A (IgA) handelt, sind nAbs auch teilweise dem IgG Typ zuzuordnen (Gold *et al.*, 2012; Lutz, 2012).

Die physiologische Funktion von nAbs umfasst die Aufrechterhaltung der Homöostase und Proteostase durch die Regulation verschiedener Zellfunktionen sowie die Beseitigung pathologisch veränderter oder nicht funktionaler Strukturen. Oxidativ geschädigte Proteine oder andere Biomoleküle, apoptotische und nekrotische Zellen sowie Proteinaggregate stören das physiologische Gleichgewicht und können über die Autoantikörper gezielt unterschiedlichen Degradationssystemen, darunter die ADAP und ADAP, zugeführt werden (Lutz, 2007; Lutz *et al.*, 2009).

Die Beseitigung von Tumorzellen sowie die Modulation inflammatorischer Prozesse durch Bindung und Neutralisation von Entzündungsmediatoren fällt ebenso in den Aufgabenbereich von nAbs (Avrameas *et al.*, 2007; Schwartz-Albiez *et al.*, 2008; Vollmers and Brandlein, 2009; Shoenfeld *et al.*, 2014; Aleksis *et al.*, 2017). Eine weitere funktionelle Aufgabe der Autoantikörper wird bei der Regeneration des Nervensystems angenommen. Hier sollen nAbs mit Oligodendrozyten wechselwirken und die Remyelinisierung von Axonen triggern, was speziell bei der Multiplen Sklerose zu einem protektiven Effekt führen kann (Miller and Rodriguez, 1995; Warrington *et al.*, 2012).

Das schädliche Pendant zu natürlichen, protektiven stellen pathologische Autoantikörper dar. Bei vielen autoimmunen und nicht-autoimmunen Erkrankungen kommt diesen eine Schlüsselrolle bei den pathologischen Vorgängen zu (Mewar and Wilson, 2006; Taplin and Barker, 2008; Rosetti *et al.*, 2012). So ist z.B. der Rheumafaktor, ein IgG-Antikörper, einer der bekanntesten Vertreter dieser Art und führt zu einem erhöhten entzündlichen Zustand bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. (Mewar and Wilson, 2006; Ingegnoli *et al.*, 2013). Zudem repräsentieren pathologische Autoantikörper bei den entsprechenden Erkrankungen ein entscheidendes Kriterium zur Diagnose (Self, 2010). Es sind vor allem Merkmale wie erhöhte Konzentrationen sowie gesteigerte Affinitäten zum Antigen, wodurch Autoantikörper pathologische Effekte entwickeln. Dabei gelten Störungen der Selektionssysteme, welche die Differenzierung und Proliferation autoreaktiver B-Zellen mit hochaffinen B-Zell-Rezeptoren üblicherweise regulieren, als deren wahrscheinlichste Ursache (Shoenfeld *et al.*, 2014; Ludwig *et al.*, 2017).

Auch im ZNS haben sowohl physiologische als auch im Zuge unterschiedlicher Erkrankungen pathologische Autoantikörper eine wesentliche Bedeutung. Unter anderem Myasthenia Gravis, Multiple Sklerose oder auch das Stiff-Person Syndrom sind typischerweise mit einer serologischen Nachweisbarkeit pathologischer Autoantikörper verknüpft, welche darüber hinaus die zugrundeliegende Pathologie begünstigen oder gar krankheitsursächlich sind (Solimena *et al.*, 1990; Jayam Trough *et al.*, 2012; Probstel *et al.*, 2015). Demgegenüber werden für nAbs im ZNS vor allem neuroprotektive Funktionen postuliert (Gold *et al.*, 2012).

Neben den bereits dargelegten, die Remyelinisierung induzierenden Autoantikörpern, konnte auch die Existenz von nAbs, welche die Proteine Alpha-Synuclein, Tau und das Prion-Protein erkennen, belegt werden (Rosenmann *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2012; Besong-Agbo *et al.*, 2013; Kronimus *et al.*, 2016). Da diese Autoantigene mit neurodegenerativen Proteinopathien assoziiert sind, darunter die Parkinson-Krankheit, verschiedenen Formen der Demenz oder die Creutzfeld-Jakob-Krankheit, werden den jeweiligen nAbs protektive Eigenschaften in Bezug auf die Pathogenese zugeschrieben (Gold *et al.*, 2012).

#### 1.4.1 Physiologische Relevanz von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> für die Alzheimer-Krankheit

Wie bereits erläutert, finden sich auch nAbs gegen A $\beta$ <sub>42</sub> im immunologischen Repertoire des Menschen wieder und werden ähnlich zu den physiologischen Autoantikörpern gegen Alpha-Synuclein, Tau und das Prion-Protein mit einer positiven Wirkung im ZNS, in diesem Fall der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht. Die Aufrechterhaltung der Proteostase als eine Hauptfunktion von nAbs stellt hierbei den entscheidenden Zusammenhang her. Aufgrund der spezifischen Bindung der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> an ihr Antigen sowie des umfangreichen Wirkspektrums von IgG im Allgemeinen könnte ein humanes, immunvermitteltes Degradationssystem bereits vorhanden sein, welches die Regulation des toxischen Agens der Alzheimer-Krankheit übernimmt und so der Pathogenese vorbeugt (Dodel *et al.*, 2002; Albus *et al.*, 2018).

Diese Hypothese konnte bereits durch eine Vielzahl von Studien untermauert werden, welche einen vielversprechenden Einfluss von nAbs-A $\beta$  auf die Alzheimer-assoziierte Pathologie dokumentieren. So zeigte sich zum einen, dass die Phagozytose des oligomeren Peptids durch primäre, murine Mikrogliazellen mithilfe von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> effektiv induziert werden kann. Weiterhin war es möglich, über den Einsatz von nAbs die indirekte Neurodegeneration aufgrund inflammatorischer Einflüsse einzudämmen. Die direkte Toxizität der A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere schien hingegen unbeeinflusst zu sein, wobei eine konzentrationsabhängige Unwirksamkeit der nAbs nicht ausgeschlossen werden konnte (Gold *et al.*, 2013). Ähnliche Resultate waren auch bei der Untersuchung von nAbs-A $\beta$ <sub>40</sub> zu beobachten.

*In vivo* Experimente mit dem weitverbreiteten Alzheimer-Mausmodell Tg2576 offenbarten nach Behandlung mit den Autoantikörpern eine Reduktion toxischer A $\beta$ -Oligomere sowie eine verbesserte synaptische Plastizität samt Kognition (Mengel *et al.*, 2013). Auch die toxischen Eigenschaften von A $\beta$ <sub>40</sub> auf humane Neuroblastomzellen konnten durch die Koinkubation mit nAbs-A $\beta$ <sub>40</sub> reduziert und die Zellviabilität gesteigert werden (Dodel *et al.*, 2011).

Anhand der Ergebnisse dieser Studien lässt sich somit eine hohe physiologische Relevanz der nAbs-A $\beta$  für die Alzheimer-Krankheit in Form eines protektiven Mechanismus ableiten und zwei entscheidende Schlüsse ziehen. Zum einen könnten pathologisch veränderte Eigenschaften der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> zu einer Störung des protektiven Systems führen, eine ätiologische Bedeutung für die Erkrankung haben und dadurch als diagnostischer Marker für die Identifikation von Patienten herangezogen werden. Während diesbezüglich quantitative Veränderungen aufgrund diverser gegensätzlicher Studienresultate vermutlich nicht in Frage kommen, fehlen qualitative Studien zu nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit gänzlich und könnten dem Bedarf an verlässlichen, frühen Biomarkern nachkommen (Kronimus *et al.*, 2018).

Zum anderen kann die über nAbs-A $\beta$  erfolgreich vermittelte Modulation pathologischer Prozesse wichtige Erkenntnisse über die notwendigen Anforderungen an einen für die Alzheimer-Therapie wirksamen Antikörper liefern. Obwohl solche Ansätze spätestens durch das Scheitern von Aducanumab einen herben Rückschlag erlitten haben, kann z.B. die Aufdeckung quantitativer und qualitativer Merkmale von nAbs sowie deren Übertragung auf therapeutische Antikörper, neue und vielversprechende Optionen eröffnen. Dies legen unter anderem Studien nahe, bei denen Patienten mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg) behandelt wurden. Trotz größerer Versuchsreihen ohne signifikante Resultate (Dodel *et al.*, 2013; Relkin *et al.*, 2017), konnten in einigen Fällen verringerte A $\beta$ -Konzentration im Liquor sowie kognitive Verbesserungen erreicht werden, welche höchstwahrscheinlich auf den Anteil spezifischer nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> in den IVIg-Präparaten zurückzuführen sind (Dodel *et al.*, 2002; Dodel *et al.*, 2004; Relkin *et al.*, 2009).

### 1.4.2 N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>: Ansatzpunkt therapeutischer und diagnostischer Strategien?

Die im vorigen Kapitel propagierte Berücksichtigung qualitativer Merkmale der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> für die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Ansätze bei der Alzheimer-Krankheit rückt unter anderem die Glykosylierung der Autoantikörper in den Fokus. Als posttranslationale Modifikation (PTM) stellt diese ein wichtiges qualitatives Merkmal von Proteinen und anderen Biomolekülen dar, welches unter anderem den Wirkmechanismus von IgG und somit mutmaßlich der nAbs-A $\beta$  in erheblichem Maße beeinflussen kann.

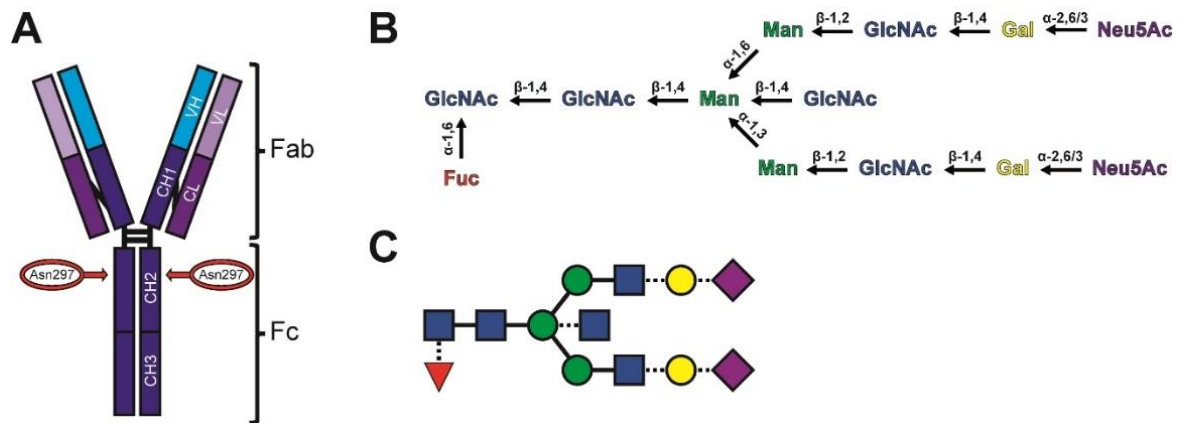
Nicht nur allgemein, sondern auch bei IgG unterscheidet man zwischen zwei Arten der Glykosylierung: O- und N-Glykosylierung (Marshall, 1972; Arnold *et al.*, 2007). Während die O-Glykosylierung hauptsächlich in den Zisternen des Golgi-Apparates durch die Übertragung kleinerer Oligosaccharide auf Sauerstoffatome der Hydroxylgruppe von Serin und Threonin erfolgt, werden N-Glykane im ER kovalent an das Stickstoffatom von Asparagin angefügt und im Golgi-Apparat prozessiert. Der Syntheseprozess an sich weist dabei ebenfalls deutliche Unterschiede auf. O-Glykane haben ihren Ursprung in der aufeinanderfolgenden und direkten Verkettung einzelner Zuckerreste, wohingegen N-Glykane zunächst als Vorläufer-Oligosaccharide mit dem membranständigen Isoprenederivat Dolichol-Phosphat und anschließend durch das Enzym Oligosaccharyltransferase mit Asparagin verknüpft werden (Wopereis *et al.*, 2006; Brockhausen *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2009; Stanley, 2011).

IgG können sowohl O-, als auch N-glykosyliert sein, wobei O-Glykane ausschließlich in der Hinge-Region von IgG-Subtyp 3 nachzuweisen sind. Da es sich hierbei um ein relativ junges Forschungsfeld handelt, sind nur wenige Informationen hinsichtlich der funktionellen Relevanz dieser Oligosaccharide existent, sodass bislang lediglich eine Schutzfunktion vor der proteolytischen Degradation vermutet wird (Plomp *et al.*, 2015). Demgegenüber existieren zahlreiche Studien, welche sich mit der N-Glykosylierung von IgG und deren funktioneller Bedeutung auseinandersetzen (Abes and Teillaud, 2010; van de Bovenkamp *et al.*, 2016). Hierbei gilt es, zwischen den beiden Fragmenten Fab und Fc zu unterscheiden.



Die Fab-Fragmente von IgG können einzig an den variablen Domänen N-Glykane tragen, wobei solche in nur ca. 15-20 % aller Fälle tatsächlich vorhanden sind (Stanley *et al.*, 2009; van de Bovenkamp *et al.*, 2016). Darüber hinaus führt die variable und für jeden Antikörper spezifische Aminosäuresequenz dieser Domänen zu mannigfaltigen Glykosylierungsstellen, welche weder zwischen verschiedenen Antikörpern vergleichbar sind, noch einen allgemeingültigen Rückschluss auf deren physiologische Bedeutung zulassen. So konnte die Anwesenheit von N-Glykanen am Fab-Fragment mit erhöhten, unveränderten, aber auch verringerten Affinitäten zum Antigen in Verbindung gebracht werden (van de Bovenkamp *et al.*, 2018).

Demgegenüber enthalten die Fc-Fragmente aller IgG eine einzige und hochkonservierte Glykosylierungsstelle am Asparagin-297 (Asn-297). Die hier angefügten Glykane weisen eine komplexe, biantennäre Struktur auf und setzen sich aus einem konstanten Kern zusammen, welcher stets aus sieben Zuckerresten besteht und zusätzlich weitere Zuckerreste tragen kann (Abb. 1.6, A-C). Während die Kernstruktur drei Mannosen (Man) und vier N-Acetylglucosamine (GlcNAc) umfasst, handelt es sich bei den potentiell additionalen Zuckern um Fucose (Fuc), GlcNAc, Galaktose (Gal) und/oder die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Da das potentiell zusätzlich angefügte GlcNAc die beiden Antennen des Glykans separiert, bezeichnet man dieses auch als „bisecting“ (englisch für halbierend) GlcNAc (b-GlcNAc) (Abes and Teillaud, 2010; Kronimus *et al.*, 2019). Im Vergleich zum Fab- weisen die Fc-Fragmente in der Regel Glykane kleinerer Strukturen mit einem deutlich geringeren Anteil von Gal und Neu5Ac auf (Bondt *et al.*, 2014).



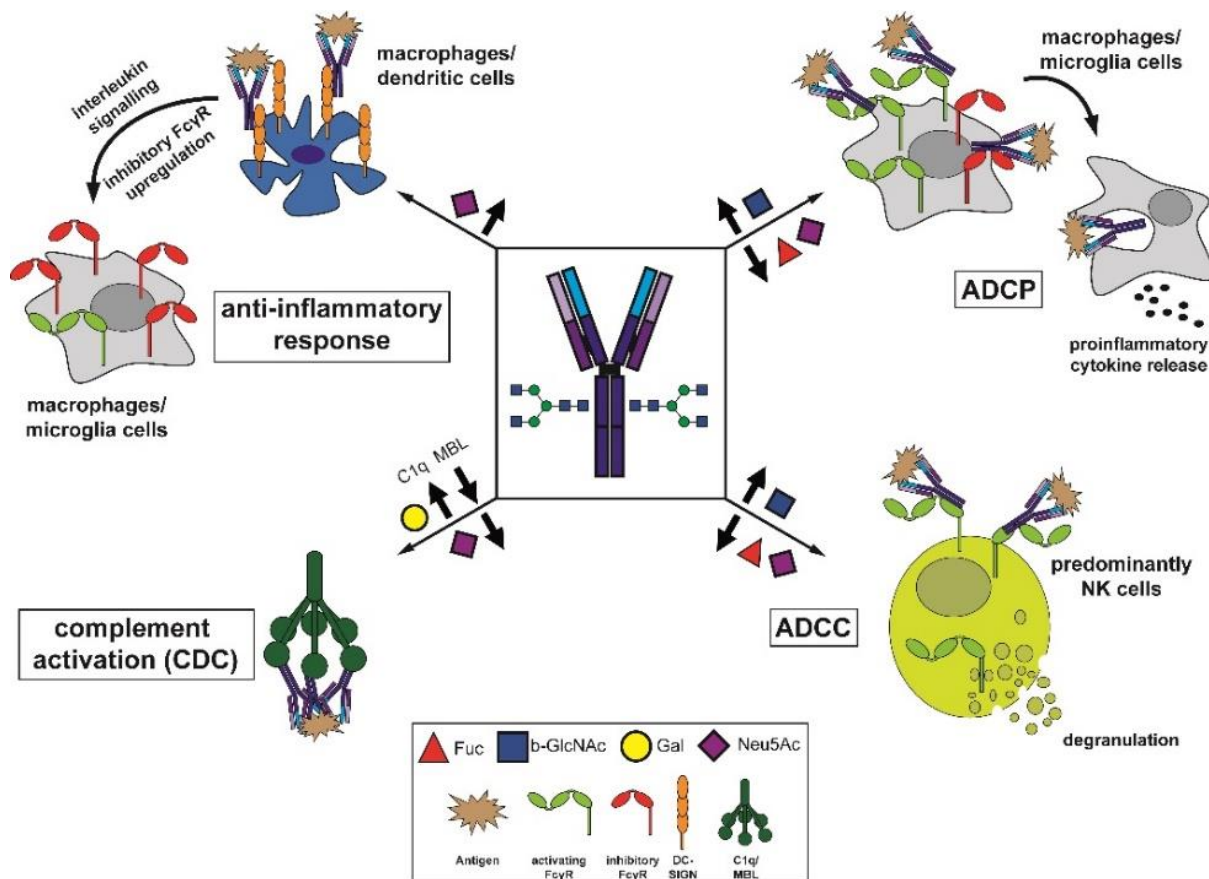
**Abbildung 1.6. IgG Glykosylierung.** **A.** Die aus zwei identisch leichten (CL und VL) und schweren Ketten (CH1-3 und VH) bestehenden IgG-Moleküle lassen sich funktionell in zwei Fab und ein Fc-Fragment(e) unterteilen. Am Fc-Fragment aller IgG finden sich an Asparagin-297 hochkonservierte N-Glykosylierungsstellen wieder. **B.** Diese N-Glykane bestehen aus einem Kern von vier N-Acetylglucosaminen (GlcNAc) und drei Mannosen (Man), welcher mit den Zuckern Fucose (Fuc), N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc), Galaktose (Gal) und N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zusätzlich erweitert sein kann. Alle Zucker sind über  $\alpha$ - oder  $\beta$ -glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. **C.** Schematische Darstellung der Glykane. (Kronimus *et al.*, 2019)

Die Zusammensetzung der IgG Fc N-Glykane ist mitentscheidend darüber, ob und inwiefern die Bindungen an bestimmte Interaktionspartner beeinflusst und dadurch Effektorfunktionen unterschiedlich stark ausgelöst werden (Abb. 1.7). So kann zum einen die Präsenz von Fuc mit einer bis zu 100-fach reduzierten IgG-Affinität zu Fc $\gamma$ R auf Makrophagen und Mikrogliazellen verknüpft werden. Der Fc $\gamma$ RIII ist dabei aufgrund gestörter Glykan-Glykan-Interaktion mit IgG am stärksten betroffen. In Folge dessen sind proinflammatorische Prozesse, darunter die ADCC und ADCP, herabreguliert, sodass Fuc antiinflammatorische Effekte zugesprochen werden (Shields *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2005; Ferrara *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2012).

Eine konträrere Wirkung scheint durch die zusätzliche Addition von b-GlcNAc ausgelöst zu werden. Die N-Acetylglucosaminierung von IgG Fc N-Glykanen führt unter anderem zu einer erhöhten Bindung an Fc $\gamma$ RIII, wobei indirekte Ursachen nicht auszuschließen sind. Das biochronologisch früher erfolgende Anfügen von N-Acetylglucosamin hemmt aufgrund sterischer Hinderungen die Aktivität der für die Fucosylierung zuständigen Fucosyltransferase, sodass der Effekt sowohl durch die Abwesenheit von Fuc, als auch durch die Anwesenheit von b-GlcNAc bedingt sein könnte (Davies *et al.*, 2001; Ferrara *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2011).

Die Addition von Neu5Ac vermittelt wie Fuc eine antiinflammatorische Wirkung von IgG. Für diese ist neben einer verringerten Affinität zu sämtlichen FcγR vermutlich ein weiterer Effekt von entscheidender Bedeutung. Sialylierte Fc N-Glykane sollen demnach die Affinität von IgG zu DC-SIGN erhöhen und eine Interleukin-33- und Interleukin-4-vermittelte Signalkaskade auslösen, an deren Ende die hochregulierte Expression von FcγRIIb steht (Kaneko *et al.*, 2006; Anthony *et al.*, 2012). Diese inhibitorischen FcγR wirken wiederum proinflammatorischen Prozessen durch Erhöhung des Schwellenwertes der Aktivierung von Immunzellen entgegen (Nimmerjahn and Ravetch, 2007).

Die Folgen zusätzlicher Gal werden bis heute kontrovers diskutiert. Zum einen ist die Galaktosylierung von Fc N-Glykanen mit einer gesteigerten IgG-Affinität an das initiale Komplementprotein C1q und dadurch mit proinflammatorischen Effekten assoziiert, zum anderen aber auch mit einer verringerten Bindung an das Mannose-bindende Lektin als alternatives Komplementprotein und folglich mit antiinflammatorischen Prozessen (Nimmerjahn *et al.*, 2007; Banda *et al.*, 2008; Houde *et al.*, 2010; Peschke *et al.*, 2017). Grundsätzlich wird jedoch eine antiinflammatorische Wirkung nahegelegt, da viele Autoimmunerkrankungen mit einem verringerten Galaktosylierungsstatus einhergehen (Pilkington *et al.*, 1995).



**Abbildung 1.7. Funktionelle Bedeutung der Fc N-Glykosylierung von IgG.** Die mögliche Addition von Fuc, b-GlcNAc, Gal oder Neu5Ac verursacht veränderte Affinitäten von IgG zu seinen Effektorstrukturen und damit verstärkte oder abgeschwächte immunologische Prozesse. Dazu gehören die Antikörper-abhängige zellvermittelte Phagozytose (englisch: antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP), die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (englisch: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), die Komplement-abhängige Zytotoxizität (englisch: complement-dependent cytotoxicity, CDC) sowie die Modulation antiinflammatorischer Reaktionen. (Kronimus *et al.*, 2019)

Es ist durch die ausführlich erläuterten und von der Zusammensetzung ihrer N-Glykane abhängigen funktionellen Eigenschaften der IgG zu begründen, weshalb die zu Beginn des Kapitels vorgeschlagene Berücksichtigung der Glykosylierung von nAbs-A $\beta_{42}$  im Rahmen der Alzheimer-Krankheit Sinn ergibt. Unter der Voraussetzung, dass N-Glykane der nAbs einen ähnlichen oder gar identischen Einfluss haben wie die der IgG, kann deren Veränderung, aufgrund der damit einhergehenden, gestörten physiologischen und protektiven Funktion der Autoantikörper, zu pathologischen und krankheitsfördernden oder gar ätiologischen Prozessen führen. Die Aufdeckung solcher Variationen birgt somit ein hohes diagnostisches Potential zum Screening von Alzheimer-Patienten.

Pathologisch veränderte Glykosylierungsmuster im Zuge vor allem autoimmuner Erkrankungen rechtfertigen diesen Ansatz zusätzlich (Tomana *et al.*, 1988; Decker *et al.*, 2016).

Darüber hinaus kann die Charakterisierung des N-Glykosylierungsmusters von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> entscheidende Erkenntnisse über deren Wirkspektrum und weiteren Eigenschaften liefern. Da bereits die physiologische Relevanz der Autoantikörper für die Alzheimer-Krankheit in diversen Studien vorgebracht wurde, könnten diese Informationen essentielle Voraussetzungen der Glykosylierung effektiver und verträglicher Antikörper für die Alzheimer-Therapie offenbaren und als Blaupause für deren Entwicklung Verwendung finden. Dieser Ansatz erfährt vor allem deshalb größere Bedeutung, da die Glykosylierung von IgG als PTM artspezifisch im ER und Golgi-Apparat stattfindet. Daher ist es nicht verwunderlich, dass das Glykosylierungsmuster der typischerweise als Expressionssystem für rekombinante, therapeutische Antikörper genutzten Zellsysteme, darunter chinesische Hamsterovarien (englisch: Chinese Hamster Ovary, CHO) oder humane, embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney, HEK), erhebliche Unterschiede zu dem des Menschen aufweist (Marth and Grewal, 2008; Bohm *et al.*, 2015; Reusch and Tejada, 2015).

## 1.5 Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit stellt die Untersuchung einer physiologischen und diagnostischen Relevanz der N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit und den zugrundeliegenden Pathomechanismen dar. Hierfür ist zunächst beabsichtigt, das N-Glykosylierungsmuster der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> zu analysieren und mit dem von herkömmlichen IgG zu vergleichen. Im Zuge dessen soll außerdem geklärt werden, ob N-Glykane der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> einen entscheidenden funktionellen Einfluss innehaben und die der Alzheimer-Krankheit zugrundeliegenden pathologischen Prozesse modulieren können. Die daraus hervorgehenden Erkenntnisse könnten neue, entscheidende Optionen für die Entwicklung therapeutischer Strategien auf Basis von Antikörpern aufzeigen. In einem zweiten Teil soll anschließend die Überprüfung des diagnostischen Nutzens der Fc N-Glykosylierung der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> erfolgen. Zu diesem Zweck werden die Glykosylierungsmuster der Autoantikörper von Alzheimer-Patienten und Kontrollprobanden analysiert und miteinander verglichen, um potentielle Unterschiede als Grundlage künftiger Biomarker identifizieren zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tabelle 2.1. Verwendete Chemikalien samt Hersteller/Lieferant.**

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	GE Healthcare
2-Propanol	Carl Roth
6-Aza-2-thiothymine	Alfa Aesar
Acetonitril	Carl Roth
Ammoniumcitrat	Sigma Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth
Argon	AirLiquid
Chloroform	Carl Roth
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva Electrophoresis
Dimethylsulfoxid	AppliChem
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
DL-Dithiothreitol	Sigma Aldrich
Essigsäure	Acros Organics
Ethanol	Carl Roth
Ethanolamin (1 M, pH 8,5)	GE Healthcare
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
HEPES (1 M)	PAN-Biotech
Hexafluorisopropanol	Sigma Aldrich
Iodacetamid	Sigma Aldrich
Iodomethan	Merck
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumbiphosphat	Carl Roth
Kohlenstoffdioxid	AirLiquid

L-Cystein-Hydrochlorid	Thermo Fisher
L-Glutamin (200 mM)	PAN-Biotech
Maltoheptaose	Sigma Aldrich
Methanol	Carl Roth
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumacetat	Sigma Aldrich
Natriumbikarbonat	Carl Roth
Natriumbiphosphat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën
N-Hydroxysuccinimid	GE Healthcare
Phosphorsäure	Sigma Aldrich
Poly-D-Lysin	Sigma Aldrich
Propidiumiodid	Sigma Aldrich
Reinstwasser	Aufbereitung Reinstwasseranlage
Salzsäure, 37 %	Carl Roth
Schwefelsäure	Carl Roth
TEMED	Carl Roth
Thioflavin T	Sigma Aldrich
Trifluoressigsäure	Thermo Fisher
TRIS	Carl Roth
Tween-20	AppliChem
Wasser (analyserein, Rotipuran)	Carl Roth
Wasser (ultrarein, Rotisolv)	Carl Roth

### 2.1.2 Polypeptide und Organismen

**Tabelle 2.2. Verwendete Peptide, Proteine, Antikörper und Enzyme samt Hersteller/Lieferant.**

Beta-Amyloid 1-42	Bachem
Beta-Amyloid 1-42, N-Terminal Cystein konjugiert	Peptide Specialty Laboratories
Beta-Amyloid 1-42, N-Terminal FITC konjugiert	Bachem
C1q Protein	Abcam
Concanavalin-A, HRP konjugiert	Sigma Aldrich
DC-SIGN	R&D Systems
Fcy-Rezeptor I, IIb, IIIa	R&D Systems
Goat Anti human IgG (H&L)	Calbiochem
Goat Anti human IgG (H&L) F(ab) <sub>2</sub> -Fragment, Biotin konjugiert	Jackson ImmunoResearch
Goat Anti human IgG (H&L), HRP konjugiert	Calbiochem
Goat Anti mouse IgG (H&L), HRP konjugiert	Calbiochem
IdeZ Protease	Promega
Mouse Anti Beta-Amyloid 6E10	Covance
Peptide-N-Glycosidase F	New England Biolabs
Sheep Anti C1q, HRP konjugiert	Abcam



## 2.1.3 Labormaterialien

**Tabelle 2.3. Verwendete Labormaterialien samt Hersteller/Lieferant.**

2,4-Dihydroxybenzoesäure	Bruker Daltonics
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Merck
4x LDS Ladepuffer (nicht reduzierend)	Life Technologies
7,5 ml Z-Gel S-Monovetten	Sarstedt
C18 Spitzen, Pierce	Thermo Fisher
CellTiter-Glo 2.0	Promega
Dulbecco's Modified Eagle Medium (4,5 g/l Glucose, 3,7 g/l Natriumbikarbonat)	PAN-Biotech
fetales Rinderserum	PAN-Biotech
Glasflaschen (50 – 100 – 250 – 500 – 1.000 – 2.000 ml)	Schott
Glasphiolen 1,4 ml Micro-V + 9 mm PP-Schraubgewindekappen	Thermo Fisher
Immunglobulin G Lösung Octagam 5 %	Octapharma
Low-Binding-Reaktionsgefäße (0,5 – 1,5 – 2 ml)	Sarstedt
Melon Gel Purification Kit	Thermo Fisher
Mikrotiterplatten, 96-Black-Well	Greiner
Mikrotiterplatten, 96-U-Well High Binding Polystyrene	Thermo Fisher
Peptid-Standard	Bruker Daltonics
pH Streifen pH Fix	Carl Roth
Phosphatgepufferte Salzlösung, steril (ohne Calcium, ohne Magnesium)	PAN-Biotech
Pipettenspitzen	Thermo Fisher
Polystyrol Disposable Plastic Columns, Pierce	Thermo Fisher
Probenröhrchen Durchflusszytometrie 5 ml	Sarstedt
Reagenzglas 15 ml Schraubverschluss mit Deckel + PTFE/Silikon Septen 18 mm Gewinde	Kobe Wicom
Reaktionsgefäße (0,5 – 1,5 – 2 – 15 – 30 ml)	Sarstedt
Rinderserumalbumin	Serva Electrophoresis
Rotiblock 10x	Carl Roth
Rotiload 4x reduzierender Ladepuffer	Carl Roth

Rotiphorese 10x SDS-PAGE	Carl Roth
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid)	Carl Roth
SeeBlue Plus 2 Prestained Protein-Leiter	Life Technologies
Serologische Pipetten (2 – 5 – 10 – 25 ml)	Sarstedt
Steril-Filter Rapid Flow Bottle Top Filter	Thermo Fisher
Streptavidin-HRP	R&D Systems
Trypsin 0,25 %/EDTA 0,53 mM	PAN-Biotech
UltraLink Iodacetyl Resin, 50 %	Thermo Fisher
Vivaspin Zentrifugalfilter	Sarstedt
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Sarstedt
Zellkulturplatten (24-Well, 96-Well)	Greiner
Zytokin ELISA Kits (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )	Thermo Fisher

#### 2.1.4 Geräte

**Tabelle 2.4. Verwendete Geräte samt Hersteller/Lieferant.**

Eismaschine RF0244A	Manitowoc
Durchflusszytometer Cytoflex S	Beckman Coulter
Durchlichtmikroskop Eclipse TS100	Nikon
Feinwaage	Sartorius
Gefrierschränke (-20 °C, -80 °C)	Sanyo
Gefriertrockner Alpha 1-4	Martin Christ
Gelkammer und Halterung	BioRad
Heizblock PCH-2	Grant-bio
Horizontalschüttler Unimax 1010	Heidolph
Inkubator C 150	Binder
Kühlschränke	Bosch, Liebherr
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph
Massenspektrometer Ultraflex I und II TOF/TOF + Anchor Chip MALDI target	Bruker Daltonics
Mikrotiterplatten-Waschautomat Amersham Biotrak II	GE Healthcare

Minizentrifuge MyFuge	Benchmark Scientific
Neubauer Zählkammer, verbessert	Brand
pH Meter InLab Routine Pro	Mettler Toledo
Pipetten (Einkanal) Reference und Research Plus (2,5 – 10 – 20 – 100 – 200 – 1.000 µl)	Eppendorf
Pipettierhelfer Accujet Pro	Brand
Plattenleser Tecan Infinite M200	Tecan Deutschland
PowerSupply Power Pac Basic	BioRad
Reagenzglasschüttler Reax	Heidolph
Reinstwasseranlage Easypure II	Werner Reinstwassersysteme
Spektrophotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab
Surface Plasmon Resonance Protein- Interaktionssystem Biacore T200 + Series S Sensor Chip CM5	GE Healthcare
Sterilwerkbank HERA safe KS 12	Thermo Fisher
Thermoschüttler MKR-13	HLC Biotech
Tischzentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus
Tischzentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf
Überkopfschüttler PTR-60	Grant-bio
Ultraschallbad Sonorex	Brandelin Electronic
Vakuumpumpe ME 4C NT	Vacuubrand
Vakuumzentrifuge Jouan RC1010	Thermo Fisher
Wärmeschrank Function Line B6	Heraeus
Wasserbad WB-10	Labortechnik Medingen

### 2.1.5 Software

**Tabelle 2.5. Verwendete Software samt Entwickler.**

Biacore T200 Control Software 2.0.2	GE Healthcare
Biacore T200 Evaluation Software 2.0	GE Healthcare
CytExpert 2.1	Beckman Coulter
Excel 2013	Microsoft
FlexAnalysis 3.4	Bruker Daltonics
FlexControl 3.4	Bruker Daltonics
Flowing Software 2.5.1	Turku Centre for Biotechnology
Illustrator CS3	Adobe
JMP	SAS-Institut
Magellan TM 6.4	Tecan
ND-1000 3.5.2	Thermo Scientific
Origin Pro 9.6	OriginLab Corporation
Photoshop CS3	Adobe
SPSS Statistics 22.0.0.0	International Business Machines Corporation
Word 2013	Microsoft

## 2.2 Patienten

Für eine explorative Patientenstudie wurden 20 Alzheimer-Patienten und 20 altersangepasste Kontrollprobanden in der Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Marburg (Ethikvotum: Aktenzeichen 173/15) sowie in der Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Essen (Kooperationspartner Prof. Dr. med. Dirk Hermann) und im Geriatrie-Zentrum Haus Berge der Universität Duisburg-Essen (Ethikvotum: Aktenzeichen 17-7450-BO) rekrutiert. Hierfür erfolgte zunächst eine Vorauswahl potentieller Studienteilnehmer hinsichtlich spezifischer Ein- und Ausschlusskriterien (Tab. 2.6; Kapitel 7.2).

Nach Aufklärung der Patienten durch einen approbierten Arzt sowie schriftlicher Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie durch den Patienten oder gesetzlich bestellten Betreuer, erfolgte eine Venenpunktion samt venöser Blutabnahme von ca. 15 ml in 7,5 ml Z-Gel S-Monovetten (Sarstedt). Noch am selben Tag wurden die Blutproben bei 3.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus), sodass der Serumüberstand in Low-Binding-Reaktionsgefäße (Sarstedt) überführt und pseudonymisiert bei -80 °C (Sanyo) gelagert werden konnte.

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von den zuständigen Ethikkommissionen genehmigt (Goodyear *et al.*, 2007).

**Tabelle 2.6. Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie.** Berücksichtigt wurden Alter, Punktzahl bei der kognitiven Testung mittels Mini-Mental-Status-Test (MMST), Diagnosekriterien sowie immunologische Faktoren. \* (McKhann *et al.*, 1984)

	Alzheimer-Patienten	Kontrollprobanden
<b>Einschlusskriterien</b>	Alter $\geq 55$	
	Punkte Mini-Mental-Status-Test $< 25$ diagnostizierte Alzheimer-Krankheit nach NINCDS-ARDA*	Punkte Mini-Mental-Status-Test $\geq 25$
<b>Ausschlusskriterien</b>	Andere Ursachen der Demenz	Diagnostizierte Alzheimer-Krankheit
	Passive Impfung in den letzten 4 Monaten	
	Behandlung mit Immunglobulinen in den letzten 4 Monaten	
	Erkrankung des blutbildenden Systems (z.B. Leukämie)	

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Aufreinigung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>

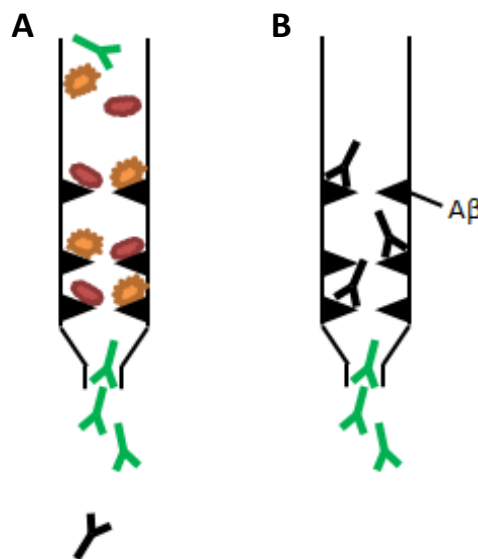
#### 2.3.1.1 Aufbau der Affinitätssäulen

Eine am Luer-Ausgang verschlossene Polystyrol-Säule (Thermo Fisher) wurde zunächst mit Natriumchlorid (1 M, NaCl, Carl Roth) befüllt und anschließend mit einer Polyethylen-Filter-scheibe besetzt. Nach Abtropfen von NaCl wurde der Säule 4 ml 50 % UltraLink Iodacetyl Matrix (Thermo Fisher) zugegeben, wodurch sich nach einiger Zeit ein 2 ml Gelbett absetzte. Anschließend erfolgte das Waschen und Äquilibrieren des Gelbetts mit Kopplungspuffer (50 mM TRIS (Carl Roth) + 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8,5, Carl Roth)). Im selbigen wurde 1 mg N-Terminal mit Cystein-gekoppeltes A $\beta$ <sub>42</sub> (Peptide Specialty Laboratories) zu 500 µg/ml gelöst und der Matrix zugegeben. Nach 15 min Überkopfschütteln (PTR-60, Grant-bio) und 30 min aufrechter Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde erneut mit Kopplungs-puffer gewaschen, ehe freie Bindestellen mithilfe eines Sättigungspuffers (50 mM L-Cystein-Hydrochlorid, Thermo Fisher) nach weiteren 15 min Überkopfschütteln und 30 min aufrechter Inkubation bei RT blockiert wurden. Das Abtropfen des Sättigungspuffers sowie mehrfaches Waschen mit NaCl (1 M) und phosphatgepufferter Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline, PBS; Zusammensetzung: 140 mM NaCl + 2,7 mM Kaliumchlorid (Carl Roth) + 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Carl Roth) + 1,8 mM Kaliumbiphosphat (Carl Roth)) stellten die letzten Schritte vor der erstmaligen Benutzung der Affinitätssäule dar.

#### 2.3.1.2 Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> erfolgte ausgehend von Serumproben humaner Einzelspen-der bzw. intravenösen Immunglobulinen G (IVIg, Octapharma) als ursprünglich therapeuti-sches Präparat. Unter Zuhilfenahme des Melon Gel Purification Kits (Thermo Fisher) und sei-ner Anwendung gemäß Herstellerangaben wurde die IgG-Fraktion aus den Serumproben ge-wonnen. Anschließend erfolgte die nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> Aufreinigung, welche für IVIg auf identische Weise durchgeführt wurde (Abb. 2.1).

Die hergestellten Affinitätssäulen wurden zunächst mit 30 ml PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml Melon Gel aufgereinigtem IgG oder IVIg befüllt. Nach Überkopfschütteln über Nacht (ü.N.) bei 4 °C (Bosch/Liebherr) erfolgte die Entfernung ungebundener Immunglobuline durch Waschen mit 30 ml PBS und 20 ml Natriumphosphatpuffer (10 mM, Zusammensetzung: 5,8 mM Natriumbiphosphat (Carl Roth) + 9,2 mM Dinatriumhydrogenphosphat, pH 6,8). Die Elution A $\beta$ <sub>42</sub>-gebundener und somit spezifischer Immunglobuline resultierte nach Zugabe von 10 ml Glycinpuffer (100 mM, pH 2,8, Carl Roth). Diese nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> Fraktion wurde in Low-Binding-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Das Waschen der Säule mit 10 ml Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 6,8), 10 ml PBS, 10 ml NaCl (1 M) und nochmals 20 ml PBS ermöglichte die erneute Verwendung der Säule, wobei maximal 30 Durchläufe pro Säule ohne messbaren Qualitätsverlust toleriert wurden. Die Lagerung von mehr als 48 h ohne Benutzung wurde bei 4 °C nach einem Waschschrift mit PBS + 0,05 % Natriumazid (Sigma Aldrich) vollzogen.



**Abbildung 2.1. Aufreinigung von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>.** **A.** IgG aus Serumproben von Einzelspendern wurde affinitätschromatographisch in einer Säule mithilfe des Melon Gel Purification Kits aufgereinigt. Die IgG-Fraktion befand sich im Durchfluss, während die restlichen Bestandteile des Serums in der Matrix zurückgehalten wurden. **B.** Ausgehend von dieser IgG-Fraktion oder IVIg wurden anschließend in einer zweiten Affinitätssäule A $\beta$ <sub>42</sub>-reaktive Immunglobuline isoliert. Hierfür wurde Cystein-konjugiertes A $\beta$ <sub>42</sub> an eine Trägermatrix gekoppelt, sodass sich spezifische nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> in der Säule und unspezifische Immunglobuline im Durchfluss befanden. (Eigene Darstellung)

### 2.3.1.3 Umpuffern/Entsalzen und Ankonzentrieren von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>

Die eluierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> wurden mittels TRIS (1 M, pH 9,0) zunächst pH-neutralisiert (pH Fix, Carl Roth). Anschließend konnten die aus IVIg isolierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> mehrerer Säulenläufe gepoolt und in Vivaspin Zentrifugalfiltern (Cut-off: 50.000 MWCO, Sarstedt) bei 8.000 g und 4 °C in PBS (PAN-Biotech) umgepuffert und ankonzentriert werden. Aus Einzelspendern gewonnene nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> wurden hingegen separat in Vivaspin Zentrifugalfiltern (Cut-off: 50.000 MWCO) bei 8.000 g und 4 °C mit Reinstwasser (rH<sub>2</sub>O) entsalzt und anschließend gefriergetrocknet (Alpha 1-4, Martin Christ). Die Lagerung der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> erfolgte stets bei -20 °C (Sanyo).

### 2.3.2 Deglykosylierung von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>

Die Entfernung der N-Glykane wurde mithilfe des Enzyms Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F; New England Biolabs) erreicht. Hierfür wurden 40 Units PNGase F pro  $\mu$ g IgG in PBS angesetzt und für 24 h in einem Wärmeschrank (Function Line B6, Heraeus) bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Trennung der Antikörper vom Enzym und den abgespaltenen Glykanen mithilfe der Vivaspin Zentrifugalfilter (Cut-off: 100.000 MWCO, Sarstedt) bei 8.000 g und 4 °C. Die deglykosylierten Immunglobuline wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.3.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Immunglobulinen, Proteinen und Peptiden erfolgte mithilfe des Spektralphotometers Nanodrop ND-1000 (Peglab) bei einer Wellenlänge von 280 nm. Hierfür wurde je 1  $\mu$ l Probe in Dreifachbestimmung und unter Berücksichtigung des jeweiligen Lösungsmittels als Blank vermessen.



#### 2.3.4 Herstellung von A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren und -Oligomeren

Rekombinantes A $\beta$ <sub>42</sub> (Bachem) wurde gefriergetrocknet geliefert und bei -20 °C gelagert. Vor Verwendung des Peptids erfolgte zunächst das Lösen des Lyophilisats in Hexafluorisopropanol (Sigma Aldrich) zu 1 mg/ml in einem Low-Binding-Reaktionsgefäß. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde die Peptidlösung entsprechend der späteren Verbrauchsmengen aliquotiert und die Ansätze für 15 min in einem Ultraschallbad (Sonorex, Brandelin Electronics) sonifiziert. Die nachfolgende Evaporation von Hexafluorisopropanol in einer Vakuumzentrifuge (Jouan RC1010, Thermo Fisher) stellte den letzten Vorbereitungsschritt dar, sodass der nun entstandene A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptidfilm bei -80 °C gelagert werden konnte.

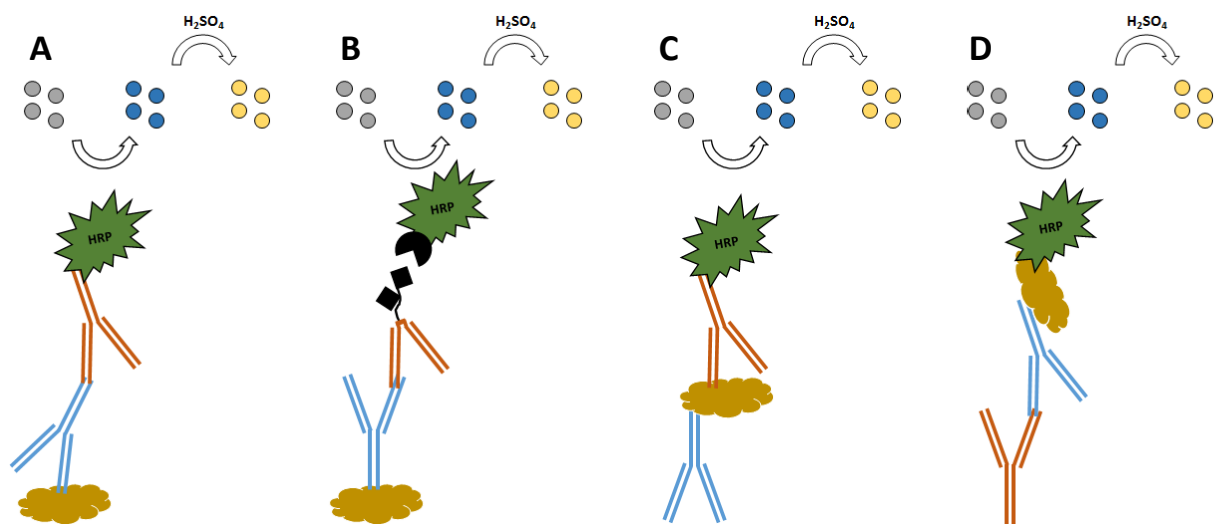
Für die Verwendung von monomerem A $\beta$ <sub>42</sub> wurde der Peptidfilm in 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO, AppliChem) aufgenommen, gründlich gevortext und anschließend mit 95 % PBS versetzt. Die Lagerung von fertig angesetztem, monomerem A $\beta$ <sub>42</sub> erfolgte für maximal 120 h bei -80 °C. Dabei wurde anhand einer angemessenen Aliquotierung das mehrfache Auf- und Abtauen vermieden.

Die Herstellung von aggregiertem, oligomerem A $\beta$ <sub>42</sub> erfolgte zunächst auf identische Weise. Nach der Aufnahme in 5 % DMSO + 95 % PBS wurde der Ansatz jedoch in einem Wärmeschrank bei 37 °C und 50 RPM (Unimax 1010, Heidolph) für 24 h inkubiert. Die so hergestellten A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere wurden ebenfalls angemessenen aliquotiert und für maximal 120 h bei -80 °C gelagert.

Neben Wildtyp A $\beta$ <sub>42</sub> wurde auch rekombinantes, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiertes A $\beta$ <sub>42</sub> (Bachem) verwendet und auf identische Weise behandelt.

### 2.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Analyse der Bindung von Immunglobulinen an Interaktionspartner fanden sowohl indirekte als auch Sandwich-ELISA-Verfahren Anwendung (Abb. 2.2).



**Abbildung 2.2. Angewandte ELISA-Verfahren.** Die Bindung verschiedener Immunglobuline (blau) an Interaktionspartner (gelb) wurde mithilfe von biotinylierten (schwarzes Quadrat), Meerrettichperoxidase- (grün, engl. horseradish peroxidase (HRP)) oder unkonjugierten Detektions- oder Capture-Antikörpern (orange), HRP-konjugiertem Streptavidin (schwarzer Kreis) oder Interaktionspartner sowie der Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, welches durch Redoxreaktionen in eine blaue und nach Zugabe von Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) in eine gelbe Lösung umschlägt, untersucht. **A.** Indirektes ELISA-Verfahren zur Untersuchung der Bindung von Immunglobulinen an  $A\beta_{42}$ . **B.** Indirektes ELISA-Verfahren zur Untersuchung der Bindung von Immunglobulinen an verschiedene Rezeptoren. Hierbei wurde auf einen  $F(ab)_2$ -Fragment Detektionsantikörper zurückgegriffen, um unspezifische Bindungen des Fc-Fragments an die Rezeptoren zu vermeiden. **C.** Sandwich-ELISA zur Untersuchung der Bindung von Immunglobulinen an das initiale Komplementprotein C1q bzw. zur Untersuchung der Konzentration bestimmter Zytokine im Zellüberstand. **D.** ELISA zur Untersuchung der Bindung von Immunglobulinen an das Lektin Concanavalin-A. (Eigene Darstellung)

#### 2.3.5.1 $A\beta_{42}$ ELISA

Die Wells von 96-Well Mikrotiterplatten (Thermo Fisher) wurden mit 5  $\mu g/ml$   $A\beta_{42}$ -Monomeren oder -Oligomeren in je 50  $\mu l$  PBS beschichtet. Nach einer Inkubation von 24 h bei 4 °C erfolgte ein Blockschrift zur Absättigung unspezifischer Bindestellen. Hierfür wurden pro Well 180  $\mu l$  Blocklösung (1x Rotiblock (Carl Roth) + 0,1 % Tween-20 (AppliChem)) für weitere 24 h bei 4 °C zugegeben.

Am Folgetag konnten verschiedene Antikörperproben (IVIg, nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> (de)glykosyliert) in einer Konzentrationsreihe, ausgehend von 4  $\mu$ g/ml, mit 50  $\mu$ l pro Well eingesetzt werden. Nach 1 h Inkubation bei RT und 100 RPM erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers (Goat Anti human IgG (H&L), Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert, 1:2.000 in Blocklösung, Calbiochem) mit einem Volumen von 50  $\mu$ l pro Well für erneut 1 h bei RT und 100 RPM. Anschließend wurde der Assay mit 50  $\mu$ l pro Well 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB, Merck) entwickelt und nach 20 min Inkubation bei RT und 100 RPM mit 5 % Schwefelsäure (Carl Roth) gestoppt. Der resultierende Farbumschlag - ein Maß für die gebundene Menge Analyt - wurde mithilfe eines Plattenlesers (Infinite M200, Tecan) bei 480 nm als optische Dichte (OD) gemessen.

Nach jedem Inkubationsschritt, bis einschließlich der Zugabe von TMB, wurden die Wells drei Mal mithilfe eines Mikrotiterplatten-Waschautomats (Amersham Biotrak II, GE Healthcare) gewaschen (PBS + 0,05 % Tween-20). Für jedes Einzelexperiment erfolgte die Untersuchung der unterschiedlichen Versuchsansätze stets in Doppelbestimmung.

#### 2.3.5.2 Rezeptor ELISA

Die Wells von 96-Well Mikrotiterplatten wurden mit 2  $\mu$ g/ml Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIb oder Fc $\gamma$ RIIIa bzw. 3  $\mu$ g/ml DC-SIGN (alle R&D Systems) in je 50  $\mu$ l PBS beschichtet. Nach einer Inkubation von 24 h bei 4 °C erfolgte ein Blockschrift zur Absättigung unspezifischer Bindestellen. Hierfür wurden pro Well 180  $\mu$ l Blocklösung (Fc $\gamma$ R: 1x Rotiblock + 0,1 % Tween-20; DC-SIGN: 10 % Rinder-serumalbumin (Serva Electrophoresis) + 0,1 % Tween-20) für 1 h bei 37 °C zugegeben. Anschließend konnten verschiedene Antikörperproben (IVIg, nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> (de)glykosyliert) in einer Konzentrationsreihe, ausgehend von 8 ng/ml (Fc $\gamma$ RI), 8  $\mu$ g/ml (Fc $\gamma$ RIIb und Fc $\gamma$ RIIIa) oder 40  $\mu$ g/ml (DC-SIGN), mit 50  $\mu$ l pro Well eingesetzt werden. Nach 1 h Inkubation bei RT und 100 RPM erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers (Goat Anti human IgG (H&L) F(ab)<sub>2</sub>-Fragment-Biotin, 1:20.000 in entsprechender Blocklösung, Jackson ImmunoResearch) mit einem Volumen von 50  $\mu$ l pro Well für erneut 1 h bei RT und 100 RPM. Anschließend wurde der Assay mit je 50  $\mu$ l pro Well Streptavidin-HRP (R&D Systems) sowie TMB für jeweils 20 min bei RT und 100 RPM entwickelt und schließlich mit 5 % Schwefelsäure gestoppt.

Der resultierende Farbumschlag - ein Maß für die gebundene Menge Analyt - wurde mithilfe eines Plattenlesers bei 480 nm als OD gemessen.

Nach jedem Inkubationsschritt, bis einschließlich der Zugabe von TMB, wurden die Wells drei Mal mithilfe eines Mikrotiterplatten-Waschautomats gewaschen (PBS + 0,05 % Tween-20). Für jedes Einzelexperiment erfolgte die Untersuchung der unterschiedlichen Versuchsansätze stets in Doppelbestimmung.

#### 2.3.5.3 C1q ELISA

Die Wells von 96-Well Mikrotiterplatten wurden mit verschiedenen Antikörperproben (IVIg, nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> (de)glykosyliert) in einer Konzentrationsreihe, ausgehend von 4  $\mu$ g/ml in je 50  $\mu$ l PBS, beschichtet. Nach einer Inkubation von 24 h bei 4 °C erfolgte ein Blockschrift zur Absättigung unspezifischer Bindestellen. Hierfür wurden pro Well 180  $\mu$ l Blocklösung (1x Rotiblock + 0,1 % Tween-20) für 1 h bei 37 °C zugegeben. Anschließend konnten je 4  $\mu$ g/ml C1q-Protein (Abcam) pro Well eingesetzt werden. Nach 1 h Inkubation bei RT und 100 RPM erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers (Sheep Anti C1q, HRP konjugiert, 1:500 in Blocklösung, Abcam) mit einem Volumen von 50  $\mu$ l pro Well für erneut 1 h bei RT und 100 RPM. Anschließend wurde der Assay mit 50  $\mu$ l pro Well TMB entwickelt und nach 20 min Inkubation bei RT und 100 RPM mit 5 % Schwefelsäure gestoppt. Der resultierende Farbumschlag - ein Maß für die gebundene Menge Analyt - wurde mithilfe eines Plattenlesers bei 480 nm als OD gemessen.

Nach jedem Inkubationsschritt, bis einschließlich der Zugabe von TMB, wurden die Wells drei Mal mithilfe eines Mikrotiterplatten-Waschautomats gewaschen (PBS + 0,05 % Tween-20). Für jedes Einzelexperiment erfolgte die Untersuchung der unterschiedlichen Versuchsansätze stets in Doppelbestimmung.

#### 2.3.5.4 Concanavalin-A ELISA

Die Wells von 96-Well Mikrotiterplatten wurden mit 4 µg/ml Capture-Antikörper (Goat Anti human IgG (H&L), Calbiochem) in 50 µl PBS beschichtet. Nach einer Inkubation von 24 h bei 4 °C erfolgte ein Blockschrift zur Absättigung unspezifischer Bindestellen. Hierfür wurden pro Well 180 µl Blocklösung (1x Rotiblock + 0,1 % Tween-20) für 1 h bei 37 °C zugegeben. Am Folgetag konnten verschiedene Antikörperproben (IVIg, nAbs-Aβ<sub>42</sub> (de)glykosyliert) mit 4 µg/ml in 50 µl Blockpuffer pro Well eingesetzt werden. Nach 1 h Inkubation bei RT und 100 RPM erfolgte die Zugabe von HRP konjugiertem Concanavalin-A (ConA, Sigma Aldrich) in einer Konzentrationsreihe, ausgehend von 10 µg/ml mit einem Volumen von je 50 µl pro Well für erneut 1 h bei RT und 100 RPM. Anschließend wurde der Assay mit 50 µl pro Well TMB entwickelt und nach 20 min Inkubation bei RT und 100 RPM mit 5 % Schwefelsäure gestoppt. Der resultierende Farbumschlag - ein Maß für die gebundene Menge Analyt - wurde mithilfe eines Plattenlesers bei 480 nm als OD gemessen.

Nach jedem Inkubationsschritt, bis einschließlich der Zugabe von TMB, wurden die Wells drei Mal mithilfe eines Mikrotiterplatten-Waschautomats gewaschen (PBS + 0,05 % Tween-20). Für jedes Einzelexperiment erfolgte die Untersuchung der unterschiedlichen Versuchsansätze stets in Doppelbestimmung.

#### 2.3.5.5 Zytokin ELISA

Die Zytokine IL-6, TNFα und IL-1β wurden im Zellüberstand mithilfe von ELISA Kits (Thermo Fisher) quantifiziert. Hierfür wurden zunächst die Wells einer 96-Well Mikrotiterplatten mit 50 µl der entsprechenden und 1:250 in PBS verdünnten Capture-Antikörper beschichtet. Nach einer Inkubation von 24 h bei 4 °C erfolgte ein Blockschrift zur Absättigung unspezifischer Bindestellen. Hierfür wurden pro Well 180 µl Blocklösung (1x Diluent) für 1 h bei 37 °C zugegeben. Anschließend konnten pro Well 50 µl 1:6 in 1x Diluent verdünnte Zellüberstände eingesetzt werden. Nach 24 h Inkubation bei 4 °C, gefolgt von 1 h Inkubation bei 37 °C, erfolgte die Zugabe des 1:250 in 1x Diluent verdünnten, biotinylierten Detektionsantikörpers mit einem Volumen von 50 µl pro Well für 1 h bei RT und 100 RPM.

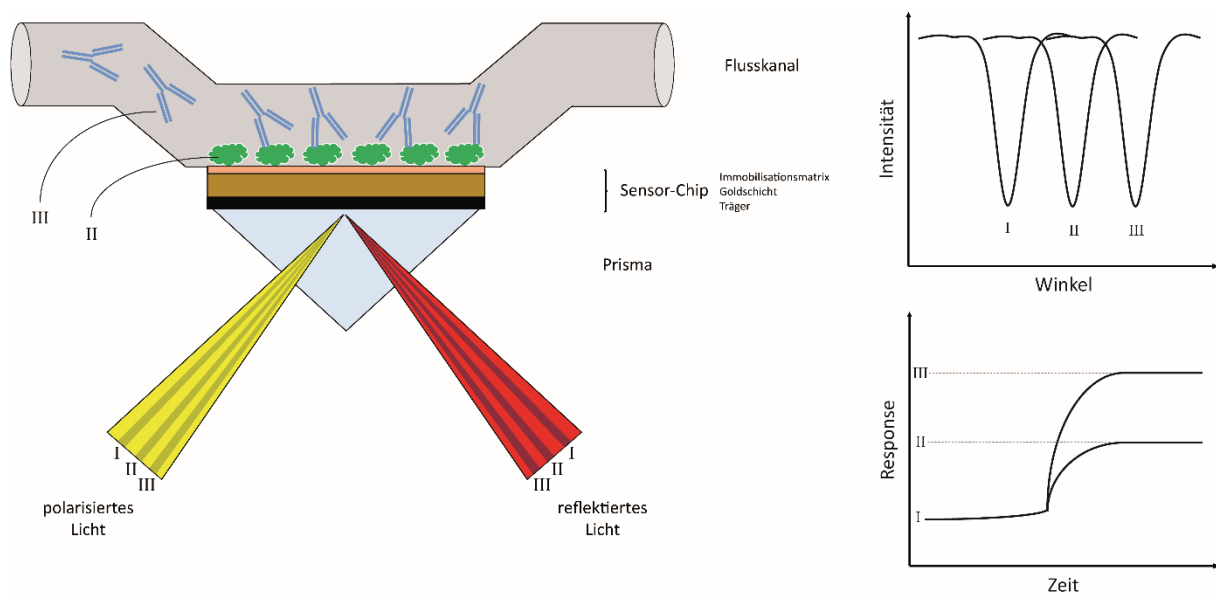
Anschließend wurde der Assay mit je 50  $\mu\text{l}$  pro Well Avidin-HRP sowie TMB für jeweils 20 min bei RT und 100 RPM entwickelt und schließlich mit 5 % Schwefelsäure gestoppt. Der resultierende Farbumschlag - ein Maß für die gebundene Menge Analyt - wurde mithilfe eines Plattenlesers bei 480 nm als OD gemessen.

Nach jedem Inkubationsschritt, bis einschließlich der Zugabe von TMB, wurden die Wells drei Mal mithilfe eines Mikrotiterplatten-Waschautomats gewaschen (PBS + 0,05 % Tween-20). Für jedes Einzelexperiment erfolgte die Untersuchung der unterschiedlichen Versuchsansätze stets in Doppelbestimmung.

### 2.3.6 Surface Plasmon Resonance (SPR) Spektroskopie

Die Bindung verschiedener Antikörperproben (IVIg, nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> (de)glykosyliert) an A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomere und -Oligomere wurde mithilfe der SPR Spektroskopie hinsichtlich der Spezifität, Avidität und Kinetik analysiert (Abb. 2.3). Diese Untersuchungen erfolgten selbstständig am Forschungszentrum Jülich (ICS-6: Strukturbiochemie, Prof. Dr. rer. nat. Dieter Willbold).

Hierfür wurden die Kanäle eines CM5 Sensor Chips (GE Healthcare) mit Carboxymethyl-Dextran Oberfläche zunächst mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid + N-Hydroxysuccinimid (1:1, GE Healthcare) für 300 s und einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  aktiviert. Anschließend erfolgte die Immobilisierung von A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren und -Oligomeren über kovalente Bindungen primärer Amine, indem die Peptide in 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 4, GE Healthcare) zu 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gelöst und mit einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  für insgesamt 180 s über je einen Kanal gegeben wurden. Nach Absättigung der Kanäle mit 1 M Ethanolamin (pH 8,5, GE Healthcare) konnte die Bindung der Antikörperproben über einer Konzentrationsreihe, beginnend bei 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS + 0,005 % Tween-20, analysiert werden. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte die Regeneration des Chips mit 0,85 % Phosphorsäure (Sigma Aldrich) für 30 s sowie PBS + 0,005 % Tween-20 für 60 s und einer Flussrate von jeweils 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Sensogramme wurden gegen einen ungecoateten Kanal referenziert (Biacore T200 Evaluation Software 2.0, GE Healthcare) und mithilfe des steady-state affinity Modells gefittet. Hierüber konnten Assoziationskonstante  $K_a$ , Dissoziationskonstante  $K_d$  sowie der  $K_D$ -Wert als reziproker Quotient dieser kinetischen Konstanten ( $K_D [\text{M}] = K_d/K_a$ ) und Maß für die Bindungsaffinität bestimmt werden.



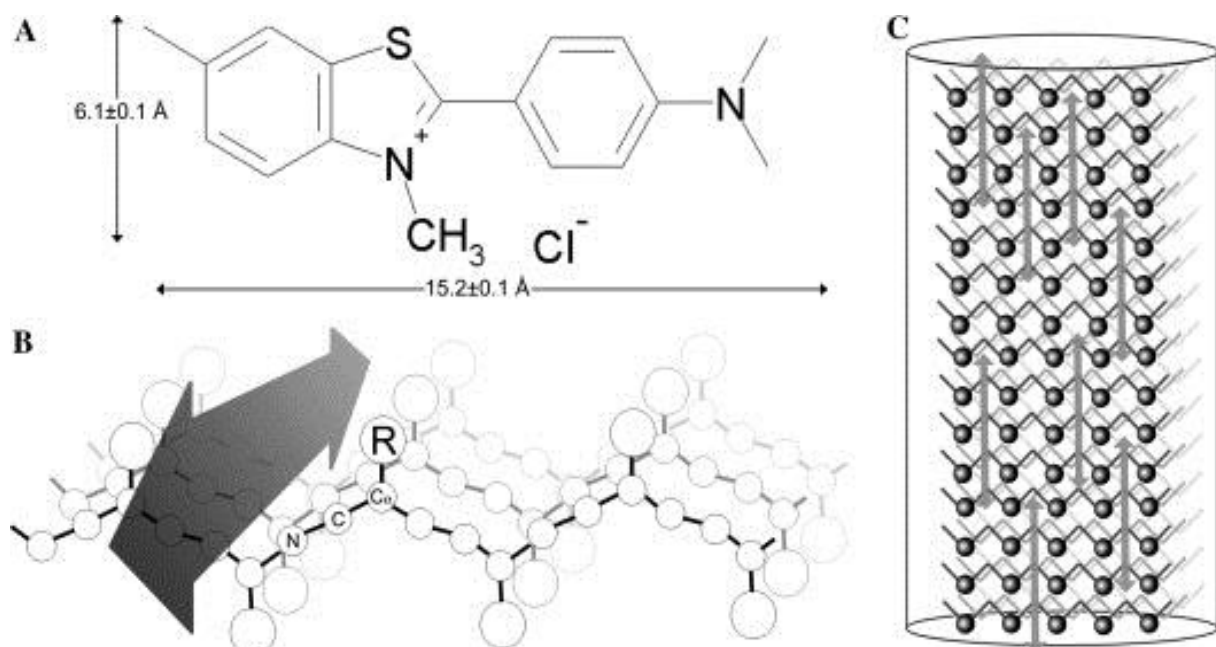
**Abbildung 2.3. Prinzip SPR Spektroskopie.** Anhand der SPR Spektroskopie können Proteininteraktionen und dabei Parameter wie Affinität, Spezifität und Bindekinetik detailliert untersucht und in Echtzeit dargestellt werden. Hierbei macht man sich die Anregung von Oberflächenplasmonen zunutze, welche als Schwingungen freier Elektronen verstanden werden. Mithilfe einer Leuchtdiode werden parallel polarisierte Lichtstrahlen auf einen mit Gold beschichteten Sensor-Chip fokussiert und an der Grenzfläche eines darunter angebrachten Prismas totalreflektiert. Das dabei entstehende evaneszente Feld führt zur Anregung der Plasmonen in der Goldschicht. Abhängig vom Einfallswinkel der Lichtstrahlen werden die Plasmonen unterschiedlich stark und unter dem so genannten Resonanz-Winkel (I) am stärksten angeregt, was zu einem gleichzeitigen Intensitätsminimum der Reflexion der Lichtstrahlen führt. Sowohl durch die Adsorption von Biomolekülen an die Oberfläche des Sensor-Chips (II), als auch durch die Interaktion weiterer Biomoleküle (III) verändert sich der Resonanzwinkel. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Winkeländerung werden von einem Detektor über die Zeit gemessen und stellen die Grundlage der SPR-Analysen dar, wodurch quantitative und kinetische Informationen der Proteininteraktion bereitgestellt werden. (Eigene Darstellung)

### 2.3.7 A $\beta$ <sub>42</sub>-Aggregation

Die Oligomerisierung bzw. Aggregation von A $\beta$ <sub>42</sub> wurde mittels Thioflavin T (ThT, Sigma Aldrich), einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der als Marker amyloido gener Proteinstrukturen genutzt werden kann, untersucht. ThT besitzt die Eigenschaft, über hydrophobe Wechselwirkungen an  $\beta$ -Faltblätter von Polypeptiden zu binden, wodurch sich das Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffs von 342 bzw. 430 nm auf 442 bzw. 482 nm verschiebt (Abb. 2.4).

Eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei 482 nm ist somit ein Indikator für die Zunahme von  $\beta$ -Faltblättern, wodurch sich die Methode für die Quantifizierung der  $A\beta_{42}$ -Aggregation eignet, da solche Sekundärstrukturen im Zuge des Peptid-Polymerisationsprozesses zunehmend auftreten.

Für die Quantifizierung der  $A\beta_{42}$ -Aggregation wurde das Peptid in Low-Binding-Reaktionsgefäßen mit einer Konzentration von 225  $\mu\text{g/ml}$  PBS angesetzt. Diesem Ansatz wurden zusätzlich 375  $\mu\text{g/ml}$  (de)glykosylierte Immunglobuline (IVIg, nAbs- $A\beta$ , mAb 6E10 (Covance)) oder das äquivalente Volumen PBS zugegeben. Anschließend erfolgte die initiale Fluoreszenzmessung (0 h) mithilfe eines Plattenlesers bei 480 nm, indem zunächst je 80  $\mu\text{l}$  Glycinpuffer (50 mM, pH 9,2) in den Wells einer 96-Black-Well Mikrotiterplatte (Greiner) vorgelegt und anschließend 10  $\mu\text{l}$  Probe und 10  $\mu\text{l}$  ThT Lösung (15  $\mu\text{g/ml}$  in Glycinpuffer) hinzugegeben wurden. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C erfolgte eine zweite Fluoreszenzmessung. Für jedes Einzelexperiment und beide Zeitpunkte wurden die unterschiedlichen Bedingungen stets in Doppelbestimmung untersucht.



**Abbildung 2.4. Prinzip des Aggregations-Assays.** Der Fluoreszenzfarbstoff ThT wurde zur Quantifizierung von  $\beta$ -Faltblättern und somit indirekt der Aggregation von  $A\beta_{42}$  verwendet. **A.** Strukturformel von ThT. **B + C.** Schematische Darstellung der ThT Interkalation in das Aminosäurerüst von Aggregaten (**B**) und Fibrillen (**C**). Dabei erfolgt die Bindung von ThT antiparallel zu und an die  $\beta$ -Faltblätter, aber parallel zur Fibrillationsachse. (Krebs *et al.*, 2005)



## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank HERA safe KS 12, Thermo Fisher) mit zwei immortalisierten, adhärent wachsenden, murinen Zelllinien gearbeitet. Die neuronale Zelllinie HT-22 wurde mithilfe des Simian-Virus 40 immortalisiert und von Prof. Dr. Gerald Thiel (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes), die mikrogliale Zelllinie BV2 retroviral immortalisiert und von Dr. Jens Neumann (Leibniz Institut für Neurobiologie, Magdeburg) bereitgestellt.

Beide Zelllinien wurden in T25 oder T75 Zellkulturflaschen (Sarstedt) und Zellkulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAN-Biotech) mit 2 mM L-Glutamin (PAN-Biotech), 200 mM HEPES (PAN-Biotech) und 10 % fetalem Rinderserum (FCS, PAN-Biotech)) bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>, AirLiquid) in einem Inkubator (C 150, Binder) kultiviert. Die Passagierung sowie die Vorbereitung Zellkultur-basierter Versuche erfolgten durch Absaugen des Zellkulturmediums, Waschen der Zellen mit sterilem PBS und anschließender Zugabe von Trypsin/EDTA (PAN-Biotech) für 5 min bei 37 °C. Nach der Trypsinierung konnte der Zellrasen durch vorsichtiges Abspülen des Bodens der Zellkulturflaschen mit Zellkulturmedium abgelöst, die Zellen in ein steriles 15 oder 50 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und anschließend bei 300 g für 5 min zentrifugiert werden. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen in einer Neubauer Zählkammer (Brand) für die weitere Kultivierung oder Zellkulturversuche gezählt.

Abhängig von der Kultivierungsdauer wurden die Zellen in entsprechender Anzahl und bis zu einer maximalen Passagenzahl von 30 ausgesät (Tab. 2.7). Die Überwachung hinsichtlich Dichte und Morphologie erfolgte dabei durchlichtmikroskopisch bei 4- und 10-facher Vergrößerung (Eclipse TS100, Nikon).

**Tabelle 2.7. Passagierung von HT-22 und BV2 Zellen.** Anzahl Zellen und Volumina Medium für die Passagierung von HT-22 und BV2 Zellen in Abhängigkeit von der Größe der Zellkulturflasche und Dauer der Kultivierung bis zur nächsten Passage.

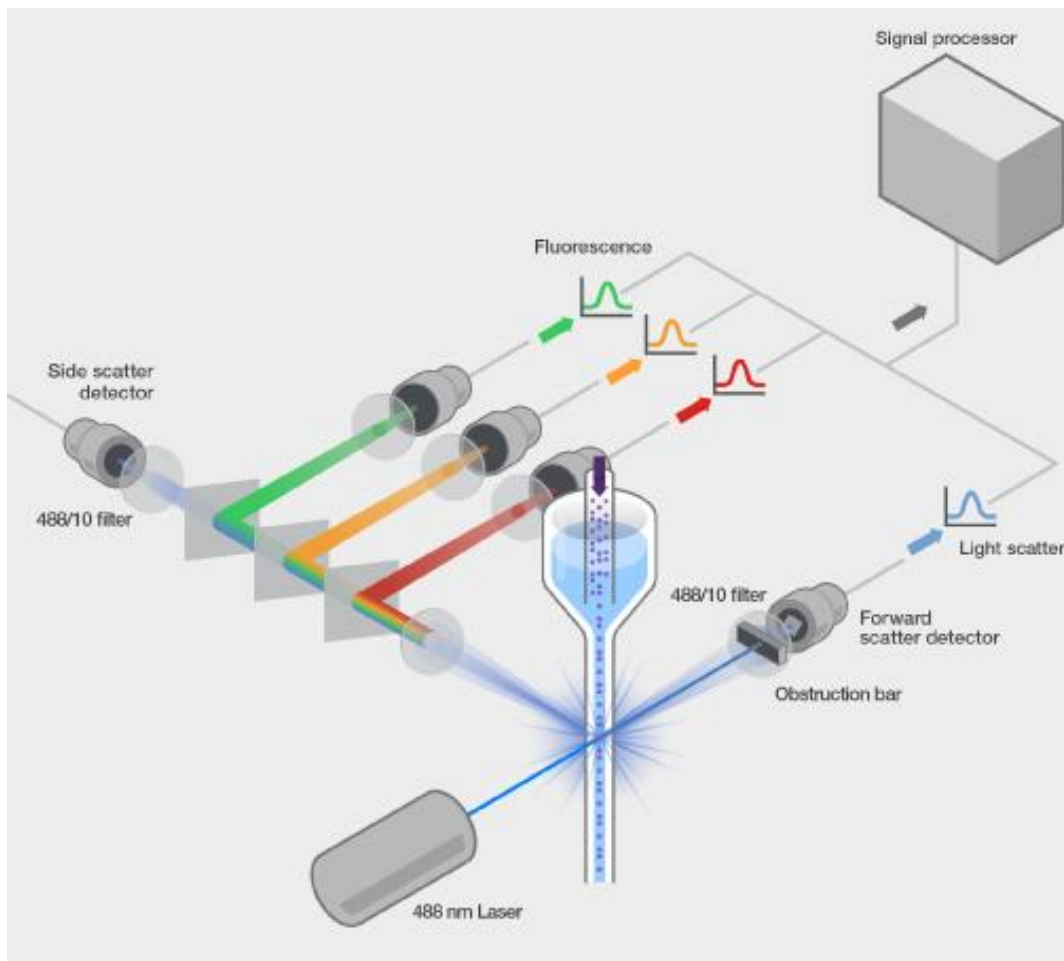
Tage Kultivierung	T25 Flasche	T75 Flasche
2	250.000 Zellen in 7 ml Medium	750.000 Zellen in 15 ml Medium
3	70.000 Zellen in 7 ml Medium	200.000 Zellen in 15 ml Medium
4	30.000 Zellen in 8 ml Medium	100.000 Zellen in 20 ml Medium

#### 2.4.2 A $\beta$ <sub>42</sub>-Phagozytose

Die Untersuchung der mikroglialen Phagozytose von A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren und -Oligomeren erfolgte mithilfe des FITC konjugierten Peptids (FITC-A $\beta$ <sub>42</sub>) sowie der murinen Zelllinie BV2 an einem Durchflusszytometer (Cytoflex S, Beckman Coulter) (Abb. 2.5). Diese Analysen wurden selbstständig am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen (PD Dr. rer. nat. Marc Seifert) durchgeführt.

In 24-Well Zellkulturplatten wurden pro Well 60.000 Zellen in 500  $\mu$ l Zellkulturmedium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h erfolgte das Absaugen des Mediums und die Behandlung der Zellen mit 3,75  $\mu$ g/ml FITC-A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren oder -Oligomeren, welche zuvor für 1 h bei 37 °C und 50 RPM mit 11,25  $\mu$ g/ml (de)glykosylierten Immunglobulinen (IVIg, nAbs-A $\beta$ , mAb 6E10) oder dem äquivalenten Volumen PBS in FCS-freiem Zellkulturmedium präinkubiert wurden. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Behandlung durch Absaugen des Mediums und dreimaligem Waschen der Zellen mit sterilem PBS gestoppt. Die Zugabe von 500  $\mu$ l sterilem PBS mit anschließender Inkubation für 5 min auf Eis löste die Zellen ab, sodass diese nach mehrfachem, intensivem Abspülen der Wells in ein Probenröhrchen für die Durchflusszytometrie (Sarstedt) überführt werden konnten. Die abgelösten Zellen wurden nach Zugabe von 500  $\mu$ l PBS + 0,04 % FCS bei 300 g für 5 min zentrifugiert und nach vorsichtigem Ausgießen des Überstandes in 100  $\mu$ l PBS + 0,04 % FCS aufgenommen. An einem Durchflusszytometer mit 488 nm Laser fand die Analyse der Zellen statt, nachdem diesen kurz vor der Messung je 1  $\mu$ l des Zelltod-Markers Propidiumiodid (1 mg/ml in PBS, Sigma Aldrich) zugegeben wurde.

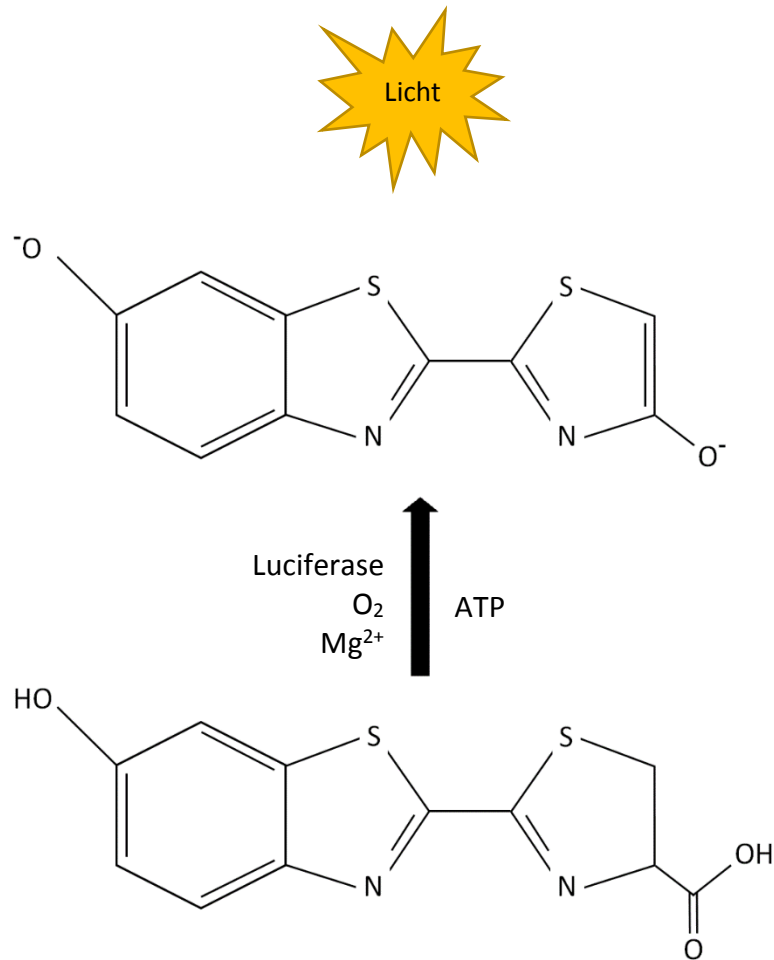
Mithilfe der Software CytExpert (Beckman Coulter) wurden pro Versuchsansatz 40.000 Zellen hinsichtlich ihrer PI- (585 nm) und FITC-Intensität (525 nm), sowie der Signalintensitäten im Forward- und Side-Scatter analysiert. Für jedes Einzelexperiment erfolgte die Untersuchung der unterschiedlichen Versuchsansätze stets in Doppelbestimmung.



**Abbildung 2.5. Prinzip der Durchflusszytometrie.** Bei der Durchflusszytometrie werden fluoreszenzmarkierte Zellen durch eine enge Kapillare einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Dabei können die Zellen über die Beugung des Laserstrahls, seine Brechung im rechten Winkel sowie über die Emission von Licht durch den Fluoreszenzfarbstoff charakterisiert werden. Der Forward-Scatter detektiert entlang des Strahlenganges die Beugung des Laserstrahls nach Auftreffen auf die Zelle und gibt Aufschluss über deren Größe, indem sich die FSC Intensität proportional zum Durchmesser der Zelle verhält. Der Side-Scatter detektiert die Brechung des Laserstrahls im rechten Winkel und gibt Aufschluss über die Granularität der Zelle, welche maßgeblich von der Anzahl an Zellorganellen und Vesikeln abhängig ist. Darüber hinaus kann über verschiedene Bandpassfilter Licht bestimmter Wellenlängen gefiltert und über optische Reflexionssysteme an Detektoren weitergeleitet werden, sodass emittiertes Licht spezifisch fluoreszenzmarkierter Zellen quantifiziert werden kann. (Thermo Fisher Scientific)

### 2.4.3 A $\beta$ <sub>42</sub>-Toxizität

Die Toxizität von A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren und -Oligomeren wurde sowohl anhand der neuronalen Zelllinie HT-22 als auch anhand der mikroglialen Zelllinie BV2 über die Zellviabilität untersucht. In mit Poly-D-Lysin (Sigma Aldrich) beschichteten 96-Well Zellkulturplatten wurden pro Well 6.000 Zellen in 100  $\mu$ l Zellkulturmedium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h erfolgte das Absaugen des Mediums und die Behandlung der Zellen mit 50  $\mu$ g/ml A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren oder -Oligomeren, welche zuvor für 1 h bei 37 °C und 50 RPM mit 200  $\mu$ g/ml (de)glykosylierten Immunglobulinen (IVIg, nAbs-A $\beta$ , mAb 6E10) oder dem äquivalenten Volumen PBS in FCS-freiem Zellkulturmedium präinkubiert wurden. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Viabilität der Zellen unter Zuhilfenahme des CellTiter-Glo 2.0 Assays (Promega) gemäß Herstellerangaben bestimmt (Abb. 2.6). Hierfür wurden zunächst alle Komponenten auf RT gebracht und den Wells anschließend 100  $\mu$ l des CellTiter-Glo Reagenz zugegeben. Im Falle der BV2 Zellen wurden zuvor die Zellüberstände geerntet, bei -20 °C weggefroren und die Wells mit 100  $\mu$ l frischem, FCS-freiem Zellkulturmedium befüllt. Nach einer 2 min Inkubation bei RT und 100 RPM, gefolgt von einer 10 min Inkubation bei RT, erfolgte die Lumineszenzmessung der einzelnen Wells mithilfe eines Plattenlesers.



**Abbildung 2.6. Prinzip CellTiter-Glo.** Beim kommerziellen CellTiter-Glo wird die Zellviabilität indirekt über die Quantifizierung von Adenosintriphosphat, welches von vitalen Zellen produziert wird, bestimmt. Dabei enthält das CellTiter-Glo Reagenz neben dem Enzym Luciferase auch das Substrat Luciferin, welches mithilfe von Adenosintriphosphat oxidativ zu Oxyluciferin decarboxyliert wird und dabei Licht emittiert. (Eigene Darstellung)

## 2.5 Glykoanalytik

### 2.5.1 Fc-F(ab)<sub>2</sub>-Präparation und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der Protease IdeZ (Promega) wurden verschiedene Antikörper in Fc- und F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente gespalten. Hierzu wurden 50 µg IVIg, 50 µg aus IVIg isolierte nAbs-Aβ<sub>42</sub>, 50 µg IgG aus Einzelspendern oder die gesamte Menge der aus Einzelspendern isolierten nAbs-Aβ<sub>42</sub> mit 100 Units IdeZ in 25 µl PBS bei 37 °C verdaut. Nach einer Inkubation ü.N. erfolgte die Zugabe von 10 µl nicht reduzierendem 4x LDS-Ladepuffer (Life Technologies) sowie das Aufkochen bei 95 °C für 5 min (PCH-2, Grant-bio). Anschließend konnten Fc- und F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente der Proben in selbst gegossenen 10 % Polyacrylamid-Gelen (Tab. 2.8) über SDS-PAGE (BioRad) bei 120 V voneinander getrennt und mittels Coomassie (Serva Electrophoresis) sichtbar gemacht werden. Für diese unspezifische Färbung basischer Aminosäuren wurde das Gel zunächst für 10 min in rH<sub>2</sub>O und anschließend in für 1 h in Coomassie-Färbelösung (0,2 % Coomassie in 50 % Methanol (Carl Roth)) bei je 100 RPM und RT geschwenkt. Durch Entfernung der Färbung und Zugabe der Entfärbelösung (50 % Methanol + 44 % rH<sub>2</sub>O + 6 % Essigsäure (Acros Organics)) konnten die Proteinbanden nach ca. 3 h bei 100 RPM und RT sichtbar gemacht werden. Es folgte die Rehydratation des Polyacrylamid-Gels mit rH<sub>2</sub>O ü.N. sowie das Ausschneiden und Zerkleinern der Fc- und F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente. Die Gelstücke wurden anschließend in rH<sub>2</sub>O-befüllte Low-Binding-Reaktionsgefäße überführt.

**Tabelle 2.8. Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.** Prozentuale Anteile einzelner Chemikalien und Lösungen für die Herstellung von 5 % Sammel- und 10 % Trenngelen. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und dessen Kante mit 2-Propanol begradigt. Nach 30 min Inkubation konnte das Sammelgel nach Entfernung von 2-Propanol direkt über dem nun polymerisierten Trenngel gegossen werden. Nach weiteren 30 min Inkubation wurde das nun fertige SDS-Gel für mindestens 24 h und höchstens 7 d bei 4 °C in 1x Rotiphorese SDS-PAGE Laufpuffer gelagert.

	<b>Sammelgel 5 %</b>	<b>Trenngel 10 %</b>
<b>Reinstwasser</b>	68,5 %	39,6 %
<b>Rotiphorese Gel 30 (Carl Roth)</b>	16,7 %	33,3 %
<b>TRIS (1,5 M, pH 8,8)</b>	12,7 %	25 %
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS, 10 %, Carl Roth)</b>	1 %	1 %
<b>Ammoniumperoxodisulfat (10 %, Carl Roth)</b>	1 %	1 %
<b>TEMED (Carl Roth)</b>	0,1 %	0,1 %
<b>Laufpuffer (Rotiphorese SDS-PAGE, Carl Roth)</b>		

### 2.5.2 Entfärbung, Reduktion, Alkylierung

Für die Entfärbung Coomassie-gefärbter Proteine fanden sowohl Acetonitril (ACN, Carl Roth) als auch Ammoniumhydrogencarbonat (AHC, Carl Roth) Verwendung, da organische Lösungsmittel hydrophobe und Salzlösungen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Coomassie herabsetzen. In einem ersten Schritt wurden die Gelstücke jeweils bei RT zunächst in 50 % ACN + 50 % 50 mM AHC für 15 min bei 700 RPM (MKR-13, HLC Biotech) und anschließend in ACN für 1 min inkubiert. Bei nicht vollständiger Entfärbung erfolgte eine Rehydratation der Gelstücke mit 50 mM AHC für 5 min bei RT sowie die Wiederholung des Entfärbevorgangs. In einer Vakuumzentrifuge wurden die Gelstücke nach vollständiger Entfärbung für ca. 30 min getrocknet, ehe die Reduktion der Disulfidbrücken der Fc- und F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente zu Thiolen und deren anschließende irreversible Alkylierung erfolgten. Hierzu wurden die Gelstücke bei 56 °C und 700 RPM in 1 mM DL-Dithiothreitol (Sigma Aldrich) und anschließend im Dunkeln bei RT und 700 RPM in 55 mM Iodacetamid (Sigma Aldrich) inkubiert.

An diese Behandlung, welche die Proteinfragmente linearisiert und entfaltet, schlossen sich erneut Waschschr tte mit 50 mM AHC und 50 % ACN + 50 % 50 mM AHC für jeweils 15 min bei 700 RPM sowie ein Inkubationsschritt mit ACN für 1 min an. Anschließend wurden die Gelstücke erneut in einer Vakuumzentrifuge für 30 min getrocknet.

### 2.5.3 In-Gel Verdau und Glykan-Extraktion

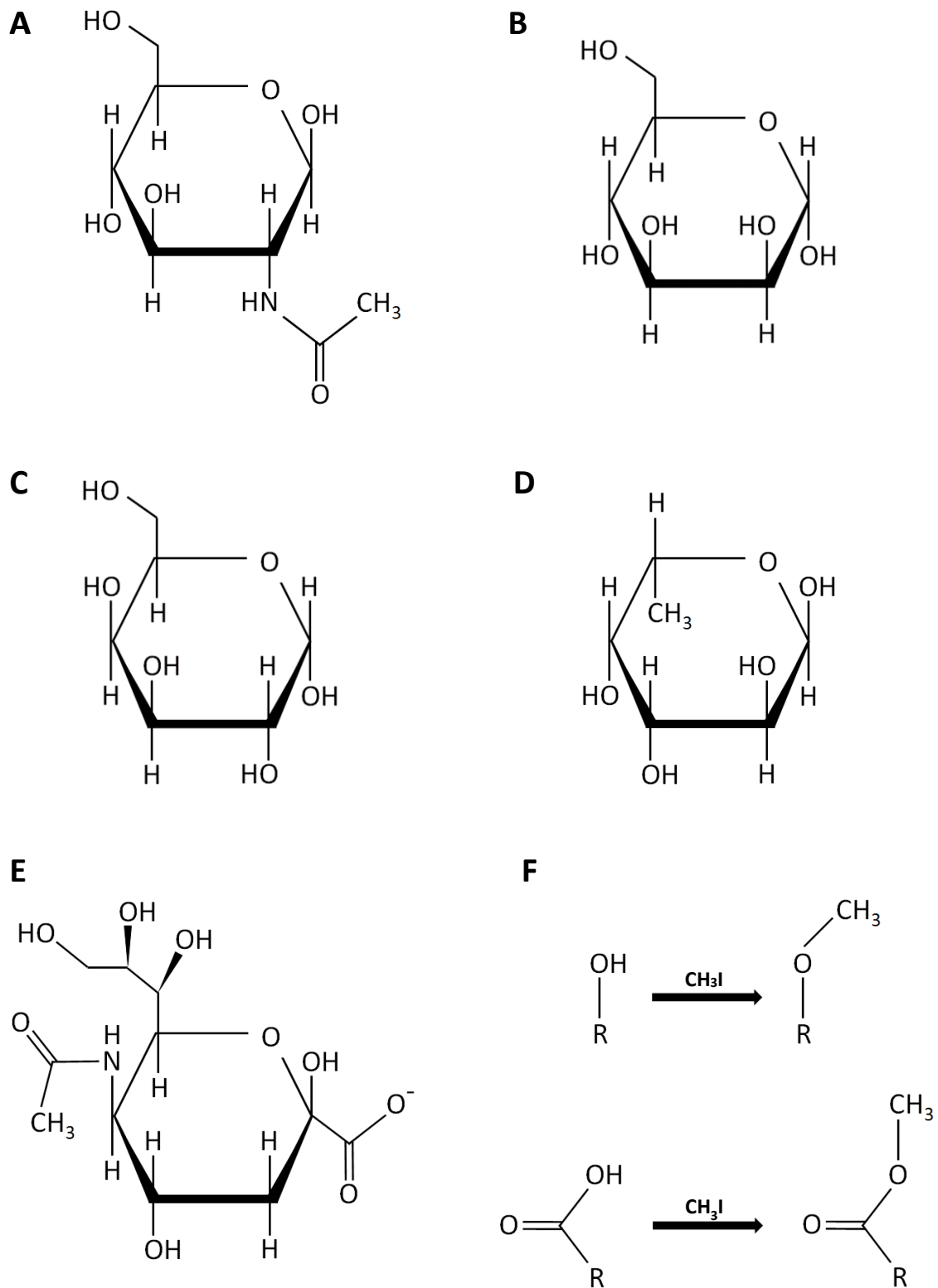
Für die Gewinnung Fc- und F(ab)<sub>2</sub>-Fragment-assoziiierter N-Glykane wurden die getrockneten Gelstücke mit 20 Units/ $\mu$ l PNGase F in 50 mM AHC und einem Volumen X inkubiert, sodass dieses knapp die Gelstücke bedeckte. Nach ca. 5 min und vollständiger Aufnahme der Enzym-lösung durch die Gelstücke wurden diese großzügig mit 50 mM AHC bedeckt und  .N. bei 37  C inkubiert. Am Folgetag konnten die enzymatisch abgetrennten Glykane aus dem Gel extrahiert werden, indem zunächst das überschüssige Volumen 50 mM AHC in ein 15 ml Reagenzglas (Kobe/Wicom)  berf hrt und den Gelstücken anschließend 200  $\mu$ l analysereines Wasser (aH<sub>2</sub>O, Carl Roth) zugegeben wurde. Durch eine Sonifikation dieses Ansatzes für 30 min konnten die Glykane aus dem Gel in die wässrige Phase und diese anschließend ebenfalls in das Reagenzglas überführt werden. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt und die extrahierten Glykane lyophilisiert.

### 2.5.4 Permethylierung

Die extrahierten Glykane wurden zur Vorbereitung massenspektrometrischer Analysen permethyliert, um die Kohlenhydratketten thermisch und vor allem Sialinsäuren chemisch zu stabilisieren, die simultane Detektion von neutralen und sauren bzw. negativ geladenen, sialylierten Glykanen durch Neutralisation der Nettoladung zu ermöglichen sowie die Ionisierbarkeit der Glykane zu verbessern (Powell and Harvey, 1996; Harvey, 2011). Bei der Permethylierung kommt es unter stark basischen Bedingungen zur Derivatisierung von Hydroxylgruppen zu Methylether und Carboxylgruppen zu Methylester nach Zugabe eines Methylierungsreagenz, im vorliegenden Fall Iodomethan (CH<sub>3</sub>I, Merck) (Abb. 2.7).



Zunächst wurden die lyophilisierten Glykane in 500 µl DMSO aufgenommen und mit ca. 10 mg zerriebenem Natriumhydroxid (Riedel-de Haën) versetzt. Anschließend erfolgten die Zugabe von 300 µl CH<sub>3</sub>I und die Sonifikation bei RT unter Argonatmosphäre (AirLiquid). Nach 80 min wurde die chemische Reaktion durch die Inkubation der Ansätze auf Eis und Zugabe von 1 ml 5 % Essigsäure gestoppt. Die permethylierten Glykane konnten anschließend aufgrund der nun erreichten Hydrophobizität mithilfe von Chloroform (Carl Roth) als unpolarem Lösungsmittel von den restlichen Lösungsbestandteilen getrennt und isoliert werden. Zu diesem Zweck wurden die Glykane drei Mal mit 600 µl Chloroform in frische Reagenzgläser überführt und mehrfach mit aH<sub>2</sub>O bis zur Neutralisation des pH-Wertes gewaschen. Unter Vakuum (Vakuumpumpe ME 4C NT, Vacuubrand) erfolgte anschließend die Evaporation des Lösungsmittels, sodass sich eine Aufreinigung und Entsalzung über C18 anschließen konnte, welche sich hydrophobe Wechselwirkungen zwischen permethylierten Glykanen und der C18 Matrix zunutze macht. Hierfür wurden die Glykane in 500 µl 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA, Thermo Fisher) aufgenommen und mit C18 Spitzen (Thermo Fisher), welche mit 300 µl 50 % ACN und 300 µl 0,1 % TFA äquilibriert wurden, mehrfach resuspendiert. Die Elution mit 300 µl 85 % ACN + 0,1 % TFA in 1,4 ml Glasphiolen (Thermo Fisher) erfolgte nach einem Waschschrift mit 300 µl 0,1 % TFA. Schlussendlich konnten die eluierten Glykane in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10 µl ultrareinem H<sub>2</sub>O (Carl Roth) aufgenommen werden.

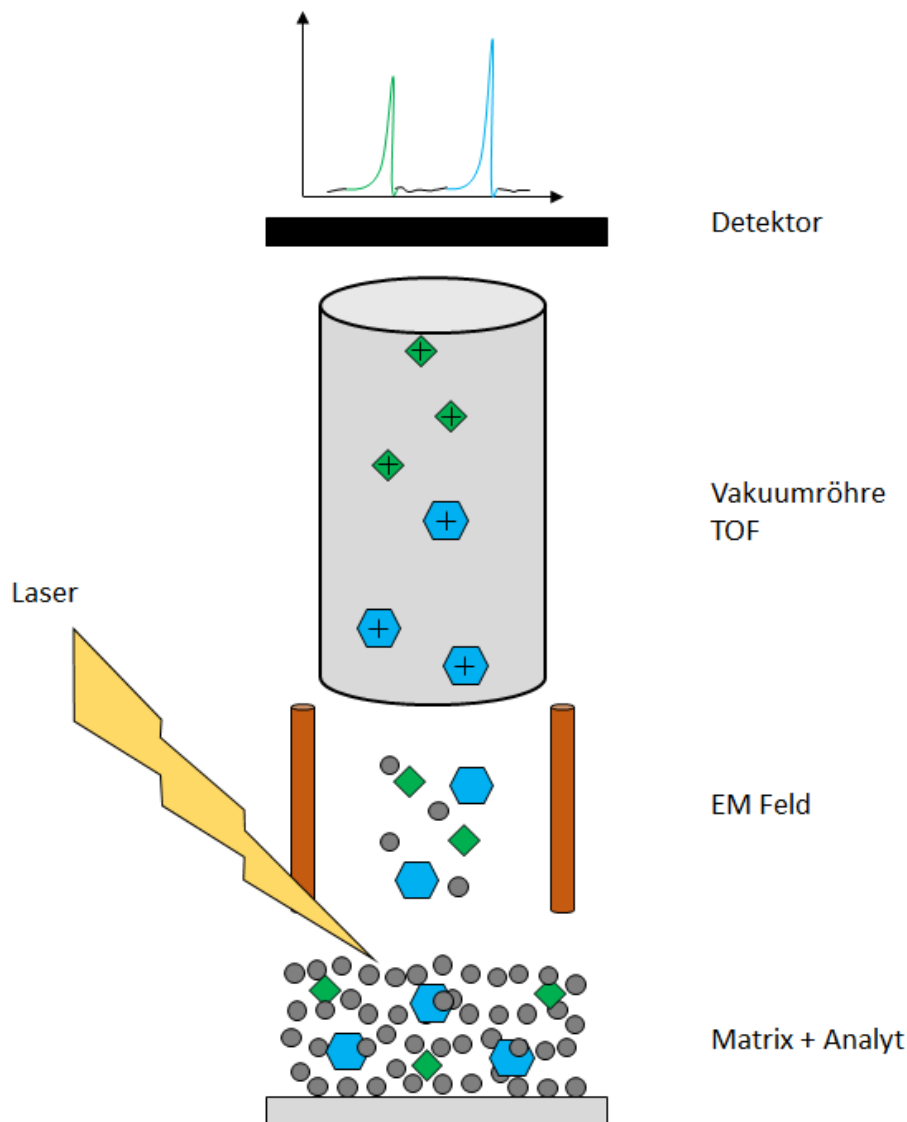


**Abbildung 2.7. Monosaccharide und der Prozess der Permethylierung.** Die in den N-Glykanen von IgG vorkommenden Monosaccharide können **(A)** N-Acetylglucosamin, **(B)** Mannose, **(C)** Galaktose, **(D)** Fucose oder **(E)** N-Acetylneuraminsäure sein. **F.** Im Zuge der Permethylierung mittels Iodomethan ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) werden Hydroxylgruppen ( $\text{OH}$ ) zu Methylether ( $\text{OCH}_3$ ) und Carboxylgruppen ( $\text{COO}^-$ ) zu Methylester ( $\text{COOCH}_3$ ) derivatisiert. (Eigene Darstellung)

### 2.5.5 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie

Permethylierte Glykane wurden mithilfe der MALDI-TOF Methode massenspektrometrisch untersucht (Ultraflex I und II TOF/TOF, Bruker Daltonics). Diese Analysen erfolgten selbstständig sowohl am Zentrum für klinische Forschung der Ruhr-Universität Bochum (Prof. Dr. rer. nat. Barbara Sitek), als auch am Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Dr. rer. nat. Günter Lochnit).

Auf den Spots einer MALDI Target Platte (Anchor Chip, Bruker Daltonics) wurde 1 µl 6-Aza-2-thiothymine (10 mg/ml (Alfa Aesar) in 10 mM Ammoniumcitrat (Sigma Aldrich)) als Matrix vorgelegt, anschließend 1 µl Probe zugegeben und beides miteinander vermischt (Abb. 2.8). Zudem wurde hiervon ausgehend direkt auf der Target Platte eine 1:2 Verdünnungsreihe der jeweiligen Probe in ATT Matrix angefertigt, um verschiedene und somit auch das ideale Analyt-Matrix-Verhältnis mit abzudecken. Um eine standardisierte Kalibrierung des Systems vor den einzelnen Messungen zu gewährleisten, wurde mit 2,4-Dihydroxybenzoesäure (Bruker Daltonics) als Matrix und einem Peptidstandard (Bruker Daltonics) auf identische Weise verfahren. Nach vollständiger Kokristallisation aller Spots bei RT erfolgte die Analyse der Proben nach Einschleusen der Target Platte. Hierfür wurden von jeder Probe und jeder Verdünnung die Summenspektren im positiven Reflektormodus unter Anwendung der Software FlexControl (Bruker Daltonics) aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mithilfe der Software FlexAnalysis (Bruker Daltonics) und der Datenbank GlycoPeakFinder, indem die Peakintensitäten der den permethylierten Glykanen entsprechenden Massewerten bestimmt wurden. Dabei wurde über das Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N) ein threshold gesetzt, sodass nur Peaks mit  $S/N > 2$  gezählt wurden. Zur Normierung der Daten wurde die Gesamtintensität aller verbleibenden Peaks herangezogen und die relative Intensität =  $\text{Peakintensität} / \text{Gesamtintensität}$  für alle Glykane als Maß der relativen Häufigkeit bestimmt.



**Abbildung 2.8. MALDI-TOF Massenspektrometrie.** Bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie handelt es sich um eine hochempfindliche Methode zur Detektion von Molekülen im Femtomol-Bereich, welche sich die Teilchen-Ladung nach Ionisation zunutze macht. Mithilfe eines Stickstofflasers und dem gepulsten Beschuss der kointakristallisierten Analyt- und Matrixmoleküle werden diese von einer Trägerplatte abgelöst und letztere aufgrund einer hohen Energieabsorption ionisiert. In der dabei entstehenden Desorptionwolke geben die ionisierten Matrixmoleküle ihre Energie an die hauptsächlich unfragmentierten Analytmoleküle ab. Abhängig von der Verwendung bestimmter Puffer, Reagenzien und Reaktionsgefäße kommt es zumeist zur Ionisation mit Natrium- ( $\text{Na}^+$ ) oder Kaliumkationen ( $\text{K}^+$ ) bzw. Protonen ( $\text{H}^+$ ). Über ein elektromagnetisches Feld mit einer Beschleunigungsspannung von 25 kV werden die positiv geladenen Analytmoleküle einem mit Vakuum evakuierten, feldfreien Flugrohr definierter Länge zugeführt. In diesem wird sich die unterschiedlich lange Flugdauer verschieden schwerer, aber identisch ionisierter Teilchen zunutze gemacht. Dabei erreichen kleinere, leichte Moleküle den Detektor früher als größere, schwere, sodass jedem detektierten Molekül eine bestimmte Masse ( $m$ ) und Ladung ( $z$ ) in Abhängigkeit der Flugzeit zugeordnet werden kann. Durch die Verwendung eines Reflektors zur Erzeugung eines elektrischen Gegenfeldes kann die Trennschärfe der Analytmoleküle durch Verlängerung der Flugzeit und –länge zusätzlich verbessert werden. (Eigene Darstellung)

## 2.6 Weitere Methoden

Die nachfolgend beschriebenen Methoden fanden in der vorliegenden Dissertation zwar Anwendung, wurden jedoch nicht selbst, sondern im Zuge von Kooperationsprojekten durchgeführt. Die zuständigen Kooperationspartner waren Dr. rer. nat. Mike Hasenberg (Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung, Universitätsklinikum Essen) für die Elektronenmikroskopie und Dr. rer. nat. Denise Zwanziger (Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen, Universitätsklinikum Essen) für die Nephelometrie.

### 2.6.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Formvar-Karbonfilm beschichtete TEM-Netze aus Kupfer (200 mesh; Plano GmbH) wurden zunächst unter Glühen ladungsneutralisiert. Die zu analysierende Probe konnte anschließend auf dem Netz mit einem Volumen von 5 µl für 2 min inkubiert, dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und die Flüssigkeit schließlich mit einem Filterpapier entfernt werden. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit 1,5 % Wolframatophosphorsäure und nach 1 min erneut die Entfernung der Lösung mittels Filterpapier. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe eines JEOL JEM 1400Plus Transmissionselektronenmikroskop und der CMOS Kamera TemCam-F416 (TVIPS GmbH) bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV aufgenommen. Die 16 bit Graustufenbilder konnten anschließend mithilfe der Software ImageJ (Version 1.52i) prozessiert werden.

### 2.6.2 Nephelometrie

Die Analyse von IgG hinsichtlich der Verteilung der Subtypen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 fand nephelometrisch mithilfe eines Dimension Vista Systems (Siemens Healthineers) statt. Hierfür wurden vier spezifische Kartuschen verwendet (Flex reagent cartridges K7080, K7081, K7082 und K7083), mit deren Hilfe die quantitative Bestimmung der vier IgG-Subtypen nach deren Bildung von Immunkomplexen, Messung des Streulichts bei 840 nm sowie Vergleich mit einem Standard mit bekannten Konzentrationen ermöglicht wurde. Die analytischen Nachweisgrenzen lagen bei 44 mg/dl für IgG1, 11 mg/dl für IgG2, 0,2 mg/dl für IgG3 und 0,3 mg/dl für IgG4.

## 2.7 Statistik

Die statistische Auswertung wurde unter Einsatz von Excel (Microsoft) und Origin Pro (Origin-Lab Corporation) für die Berechnung von Lageparametern sowie mithilfe von SPSS (International Business Machines Corporation) für die Durchführung von Signifikanztests umgesetzt. Jedes Experiment wurde in mindestens drei unabhängigen Wiederholungen und diese wiederum an verschiedenen Versuchstagen durchgeführt. Anschließend erfolgte stets eine Normierung der Daten, um die Ergebnisse der Einzelexperimente vergleichbar zu machen.

Sämtliche statistische Testverfahren umfassten zunächst die Überprüfung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test. Bei gegebener Normalverteilung wurden die Daten mithilfe des t-Tests für unverbundene oder verbundene Stichproben, bei nicht normalverteilten Daten mittels Mann-Whitney-U- (unverbunden) oder Wilcoxon-Tests (verbunden) auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Multiple Vergleiche erfolgten unter Zuhilfenahme von ein- (unverbunden) oder mehrfaktoriellen (verbunden) Varianzanalysen (ANOVA, normalverteilt) bzw. des Kruskal-Wallis- (nicht normalverteilt; unverbunden) oder Friedman-Tests (nicht normalverteilt; verbunden).

Darüber hinaus wurden Korrelationsanalysen zur Aufdeckung linearer Zusammenhänge zwischen zwei Parametern angestellt. Hierfür wurde auf das Modell nach Pearson zurückgegriffen. Demgegenüber fand ein generalisiertes lineares Modell mit binomialer Verteilung und Logit-Link-Funktion Anwendung (JMP, SAS-Institut), um einen möglichen Zusammenhang zwischen einer spezifischen Antwortvariablen und mehrerer Prädiktoren zu identifizieren. Dieses Modell wurde in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Bettina Budeus entworfen (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen).

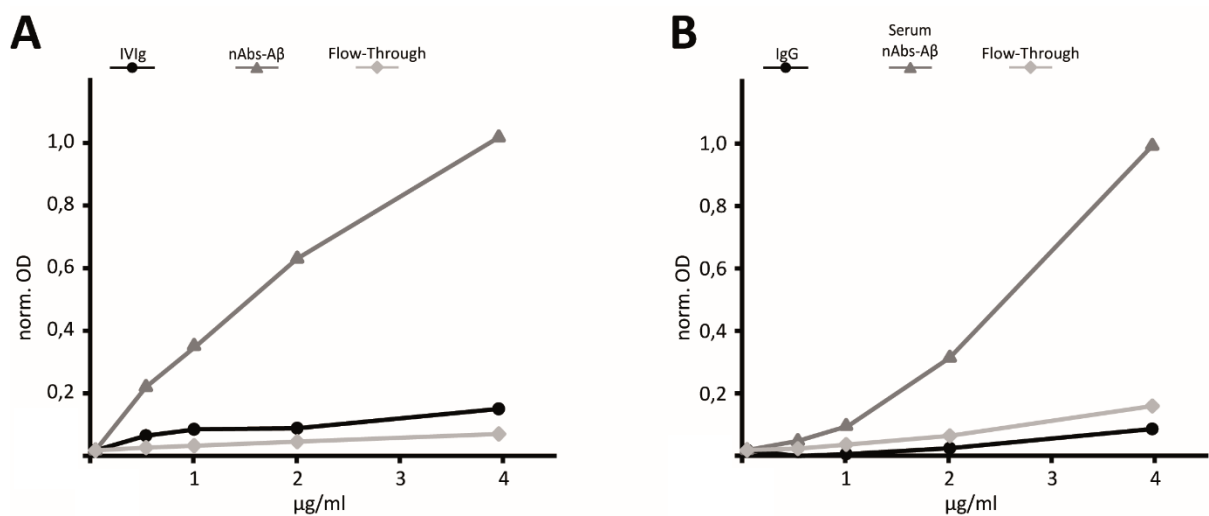
In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen drei Signifikanzniveaus mit  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*) unterschieden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Grundlegende Vorversuche

Für die Durchführung sämtlicher für diese Arbeit relevanten Experimente war zunächst die spezifische Aufreinigung von nAbs-A $\beta_{42}$ , eine effiziente Deglykosylierung von IgG, sowie die erfolgreiche Herstellung von A $\beta_{42}$ -Oligomeren nachzuweisen.

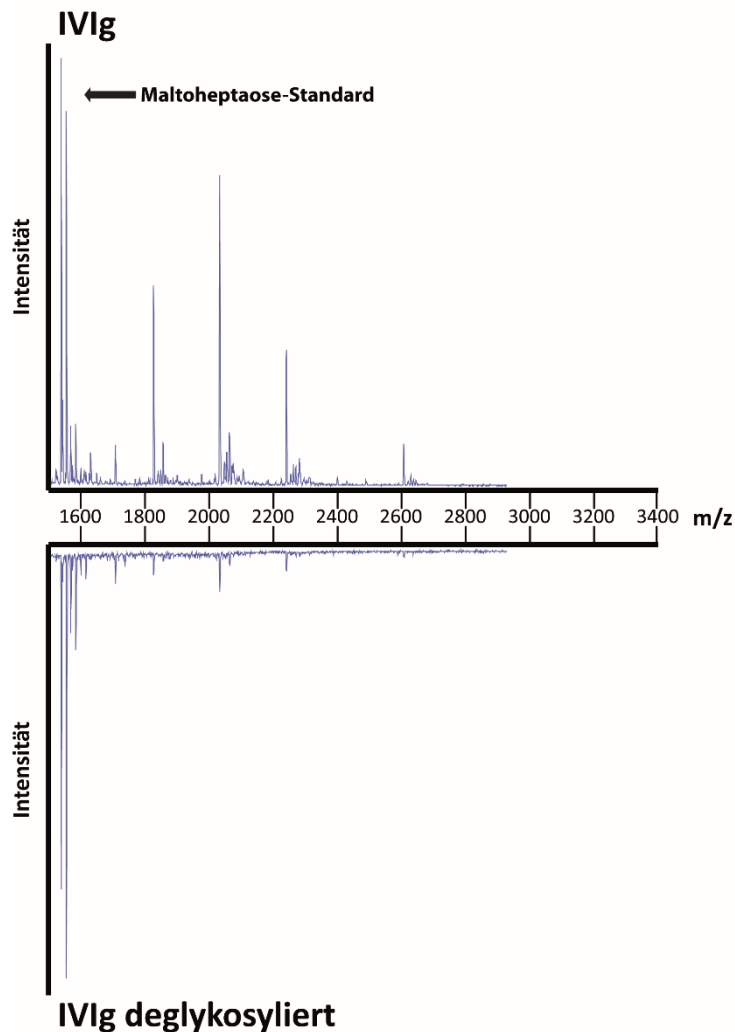
Die spezifische Isolation von nAbs-A $\beta_{42}$  wurde in ELISA-Experimenten überprüft (Abb. 3.1). Dazu erfolgte eine Analyse der Bindung an A $\beta_{42}$  von zum einen aus IVIg (Abb. 3.1, A) und zum anderen aus Serumproben (Abb. 3.1, B) affinitätschromatographisch aufgereinigten nAbs im Vergleich zu Gesamt-IgG bzw. dem ungebundenen Säulendurchfluss (Flow-Through, FT). In beiden Fällen konnte eine spezifische und die mit Abstand stärkste Bindung an das Peptid für die aufgereinigten Antikörper festgestellt werden, während Gesamt-IgG bzw. FT nahezu keine nachweisbaren Interaktionen zeigten.



**Abbildung 3.1. Überprüfung der spezifischen Aufreinigung von nAbs-A $\beta_{42}$ .** Die Bindung von aus IVIg (A) bzw. Serum (B) aufgereinigten nAbs-A $\beta_{42}$  sowie Gesamt-IgG und dem Säulendurchfluss (Flow-Through, FT) an A $\beta_{42}$  wurde anhand von Konzentrationsreihen, ausgehend von 4  $\mu$ g/ml Antikörper getestet. Dabei erfolgte die Normierung der Daten auf die durch 4  $\mu$ g/ml nAbs-A $\beta_{42}$  hervorgerufene OD.

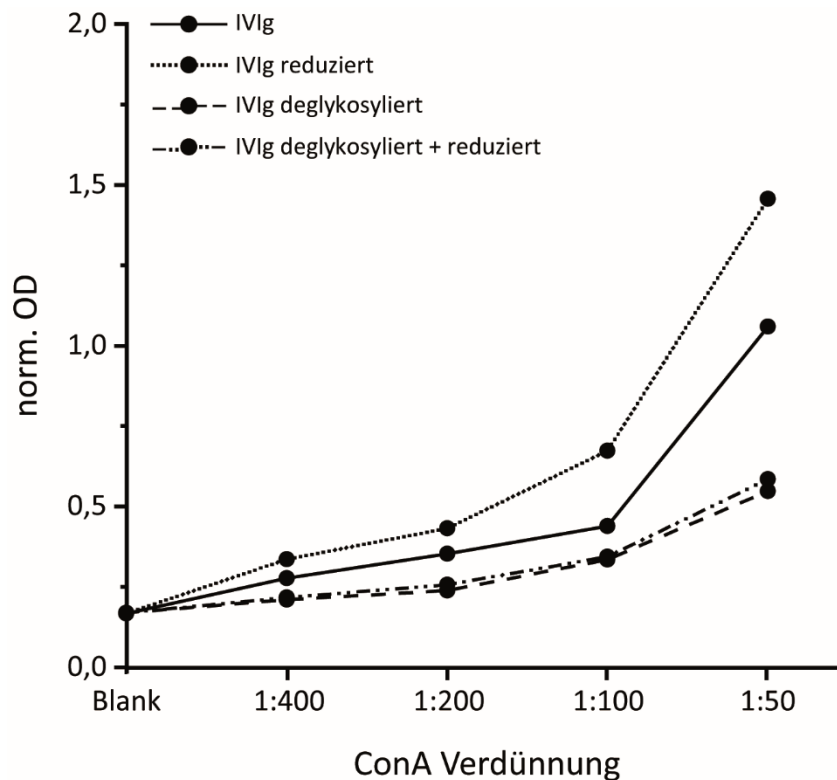
Ein weiterer essentieller Vorversuch stellte die Verifizierung der erfolgreichen Deglykosylierung der Antikörper dar. Hierzu wurde anhand von IVIg der Glykosylierungsstatus vor und nach PNGase F Behandlung sowohl massenspektrometrisch als auch im ELISA kontrolliert. Bei der MALDI-TOF massenspektrometrischen Analyse erfolgte die Zugabe eines Maltoheptaose-Standards vor der Durchführung der Probenvorbereitung, um die final aufgenommenen Massenspektren quantitativ miteinander vergleichen zu können. Die mit PNGase F vorbehandelten Antikörper zeigten bei gleicher Intensität des Maltoheptaose-Standards einen deutlichen Intensitätsverlust der durch die N-Glykane verursachten Signale (Abb. 3.2). Der Quotient  $\frac{\text{IVIg deglykosyliert}\left(\frac{\text{Peak 2040}}{\text{Peak Standard}}\right)}{\text{IVIg}\left(\frac{\text{Peak 2040}}{\text{Peak Standard}}\right)}$  wurde dabei zur Quantifizierung der enzymatischen Deglykosylierung herangezogen und ergab eine Effizienz von 83,4 %.





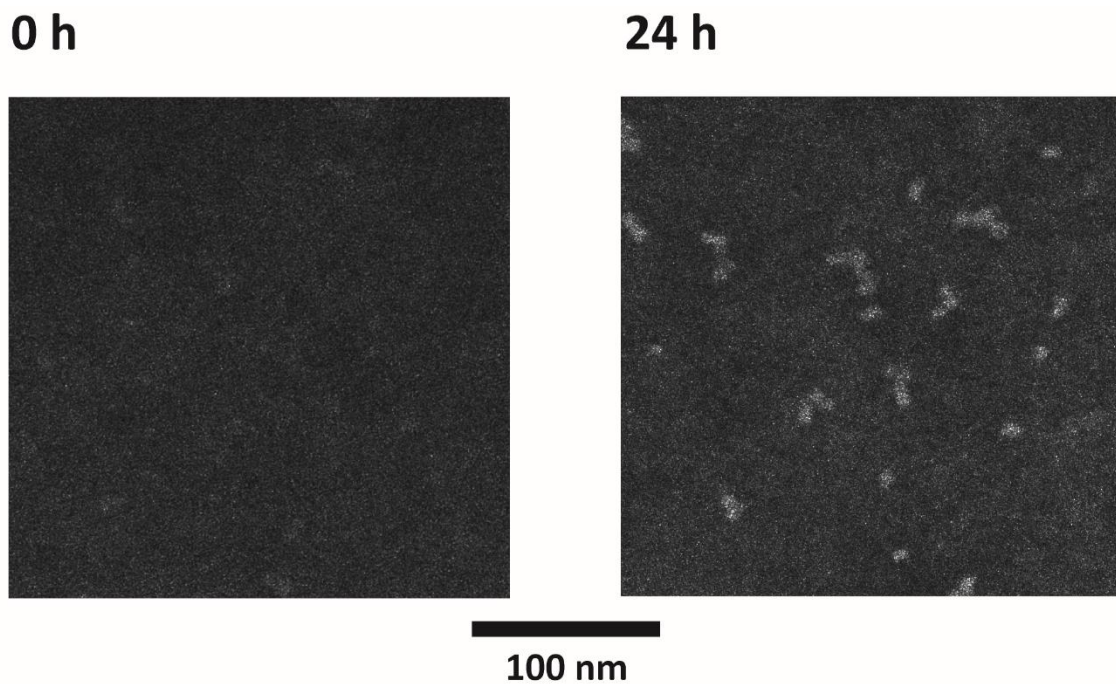
**Abbildung 3.2. Massenspektrum der N-Glykosylierung vor und nach PNGase Behandlung.** IVIg wurde sowohl mit als auch ohne PNGase F für 24 h vorbehandelt. Nach Vivaspin-Waschung und Zugabe eines Maltoheptaose-Standards erfolgte anschließend die Probenvorbereitung, an deren Ende sich ein zweiter PNGase Verdau zur Isolation und massenspektrometrischen Untersuchung der übrigen N-Glykane anschloss. Die mit PNGase vorbehandelten Antikörper zeigten bei identischer Intensität des Standards einen deutlichen Intensitätsverlust der Glykan-vermittelten Signale.

Zusätzlich zur Massenspektrometrie erfolgte eine zweite Überprüfung der Deglykosylierung mithilfe eines ConA Lektin ELISAs (Abb. 3.3). Unterschiedliche IVIg-Präparationen wurden hinsichtlich der Bindung von ConA untersucht und ein Vergleich nach Normierung auf die unbehandelte Antikörperprobe angestellt. Dabei rief eine durch Reduktion vermittelte Denaturierung von IVIg eine Erhöhung der normierten OD auf 1,4 hervor. Die Deglykosylierung der unbehandelten sowie reduzierten Antikörperprobe führte hingegen zu einer deutlich reduzierten ConA-Affinität, welche zwischen beiden Bedingungen jedoch nahezu identisch war (IVIg deglykosyliert: 0,518; IVIg deglykosyliert und reduziert: 0,553).



**Abbildung 3.3. Auswirkungen der Deglykosylierung auf die ConA Bindung.** Die Bindung des Lektins ConA an verschiedene IVIg Präparationen (unbehandelt, reduziert, deglykosyliert, deglykosyliert und reduziert) wurde anhand einer Verdünnungsreihe getestet. Dabei erfolgte die Normierung der Daten auf die OD der unbehandelten Antikörperprobe und einer ConA Verdünnung von 1:50.

Neben dem Nachweis der spezifischen Aufreinigung und Deglykosylierung von nAbs- $A\beta_{42}$  war es ebenso von zentraler Bedeutung, über die Unterscheidung von monomerem und oligomeren  $A\beta_{42}$  einen umfassenderen Überblick über die funktionellen Eigenschaften der Antikörper zu erhalten. Eine strukturelle Überprüfung der  $A\beta_{42}$ -Oligomere stellte somit einen entscheidenden Vorversuch dar und wurde mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen erreicht (Abb. 3.4). Im Vergleich zur monomeren Peptidform zum Zeitpunkt 0, zeigten sich nach 24 h Inkubation größere Formationen von  $A\beta_{42}$ , welche fortan für die experimentellen Untersuchungen mit  $A\beta_{42}$ -Oligomeren Verwendung fanden.



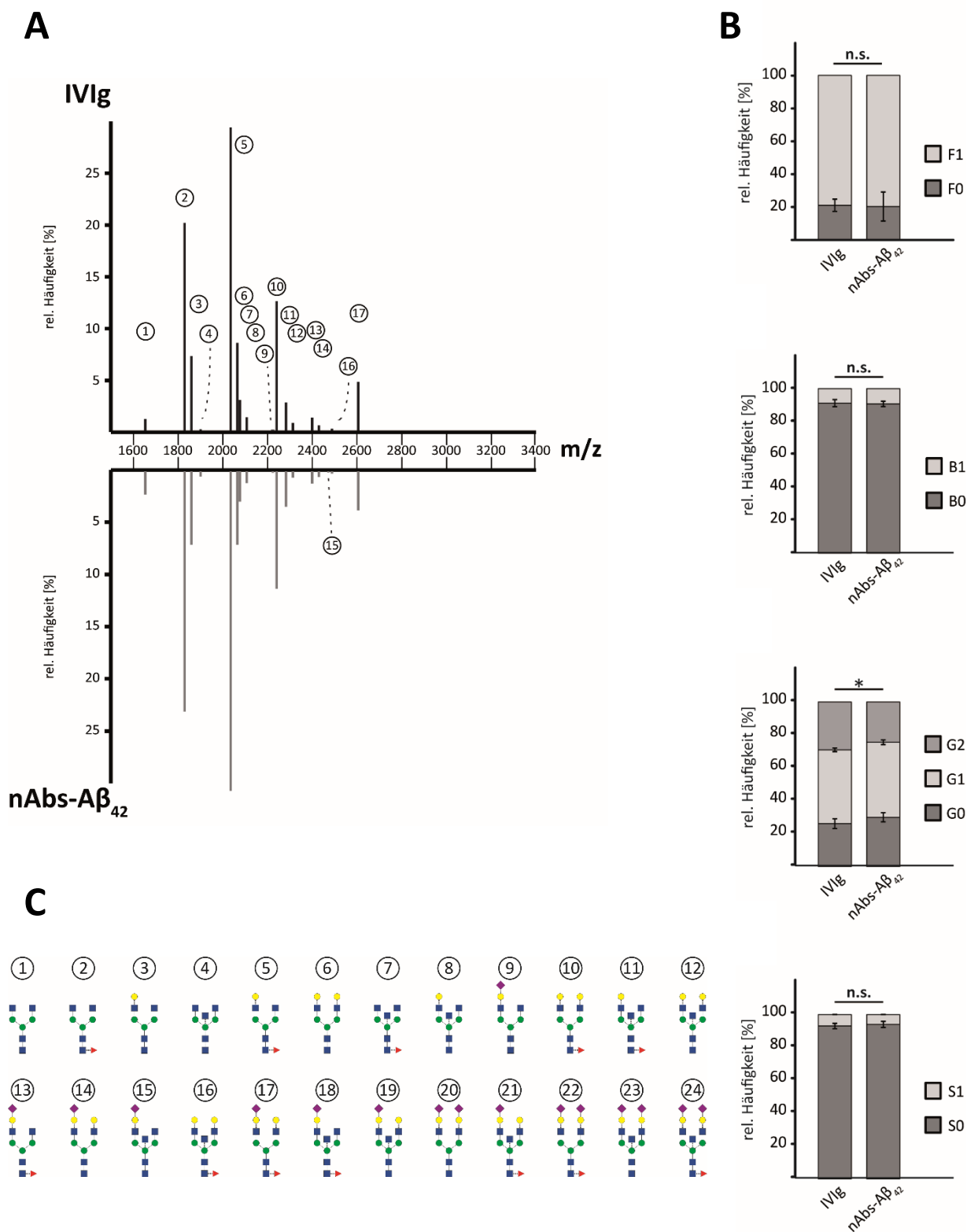
**Abbildung 3.4. Aggregation von  $A\beta_{42}$ .** Mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Aggregation von  $A\beta_{42}$  kontrolliert. Hierzu erfolgten ein negative staining der Peptide mit Wolframatophosphorsäure und deren anschließende Mikroskopie. Die dadurch generierten Graustufenbilder zeigen Peptidstrukturen als helle Bereiche auf einem dunkel gefärbten Hintergrund. Während für das 0 h inkubierte Peptid keinerlei größere Strukturen nachzuweisen waren, zeigten sich bei  $A\beta_{42}$ , welches für 24 h inkubiert wurde, vor allem sphärische Oligomere.

### 3.2 Glykosylierungsmuster der nAbs- $A\beta_{42}$

Für den Nachweis einer physiologischen und diagnostischen Relevanz der N-Glykosylierung von nAbs- $A\beta_{42}$  war es in einem ersten Schritt das Ziel, das Glykosylierungsmuster der Autoantikörper zu charakterisieren und mit dem von IVIg als Modell herkömmlicher Immunglobuline G zu vergleichen. Hierzu erfolgte eine MALDI-TOF-basierte, massenspektrometrische Untersuchung der Fab und Fc N-Glykane beider Antikörperproben. Die Massenspektren mehrerer Messungen wurden nach Normierung der einzelnen Peakintensitäten auf die jeweilige Gesamtintensität gemittelt, wodurch die relativen Häufigkeiten der einzelnen Glykane dargestellt werden konnten.

Das Fc N-Glykosylierungsmuster von IVIg zeigte insgesamt 16 von 24 möglichen Glykanen unterschiedlicher Zusammensetzung (Abb. 3.5, A+C; Tab. 3.1). Dabei waren der fucosylierte und einfach galaktosylierte Glykan (Nr. 5), gefolgt vom rein fucosylierten Glykan (Nr. 2) am häufigsten zu detektieren. Sialylierte sowie größere Glykane konnten hingegen in deutlich geringerem Maße nachgewiesen werden. Ähnliche Verteilungen samt relativer Häufigkeiten wurden für das Fc N-Glykosylierungsmuster der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> identifiziert, während sich mit Glykan Nr. 15 ein zusätzliches Oligosaccharid zeigte (Abb. 3.5, A+C; Tab. 3.1). Signifikante Unterschiede ( $p = 0,033$ ) waren hingegen nur bei Glykan Nr. 1 zu finden, welcher bei IVIg mit ca.  $1,1 \pm 0,8$  % einen geringeren Anteil ausmachte, als bei nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> mit  $2,3 \pm 0,3$  % (Abb. 3.5, A+C; Tab. 3.1, Tab. A1).

Sowohl IVIg, als auch nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>-assoziierte Fc N-Glykane wurden zudem hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur vorhandenen Zucker in Gruppen zusammengefasst und miteinander verglichen (Abb. 3.5, B; Tab. 3.2). Glykane mit (F1) oder ohne (F0) Fuc, mit (B1) oder ohne (B0) b-GlcNAc, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Gal sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) Neu5Ac können gemäß Literatur unterschiedliche funktionelle Eigenschaften der Antikörper triggern, was einen solch kompakten Zusammenschluss rechtfertigt. Signifikante Unterschiede fanden sich lediglich beim Galaktosylierungsstatus wieder. Hier wiesen Fc N-Glykane der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> mit  $24,5 \pm 1,8$  % einen geringeren Anteil zweifach galaktosylierter Glykane auf als IVIg mit  $29,1 \pm 2,6$  % ( $p = 0,02$ ) (Abb. 3.5, B; Tab. 3.2; Tab. A1).

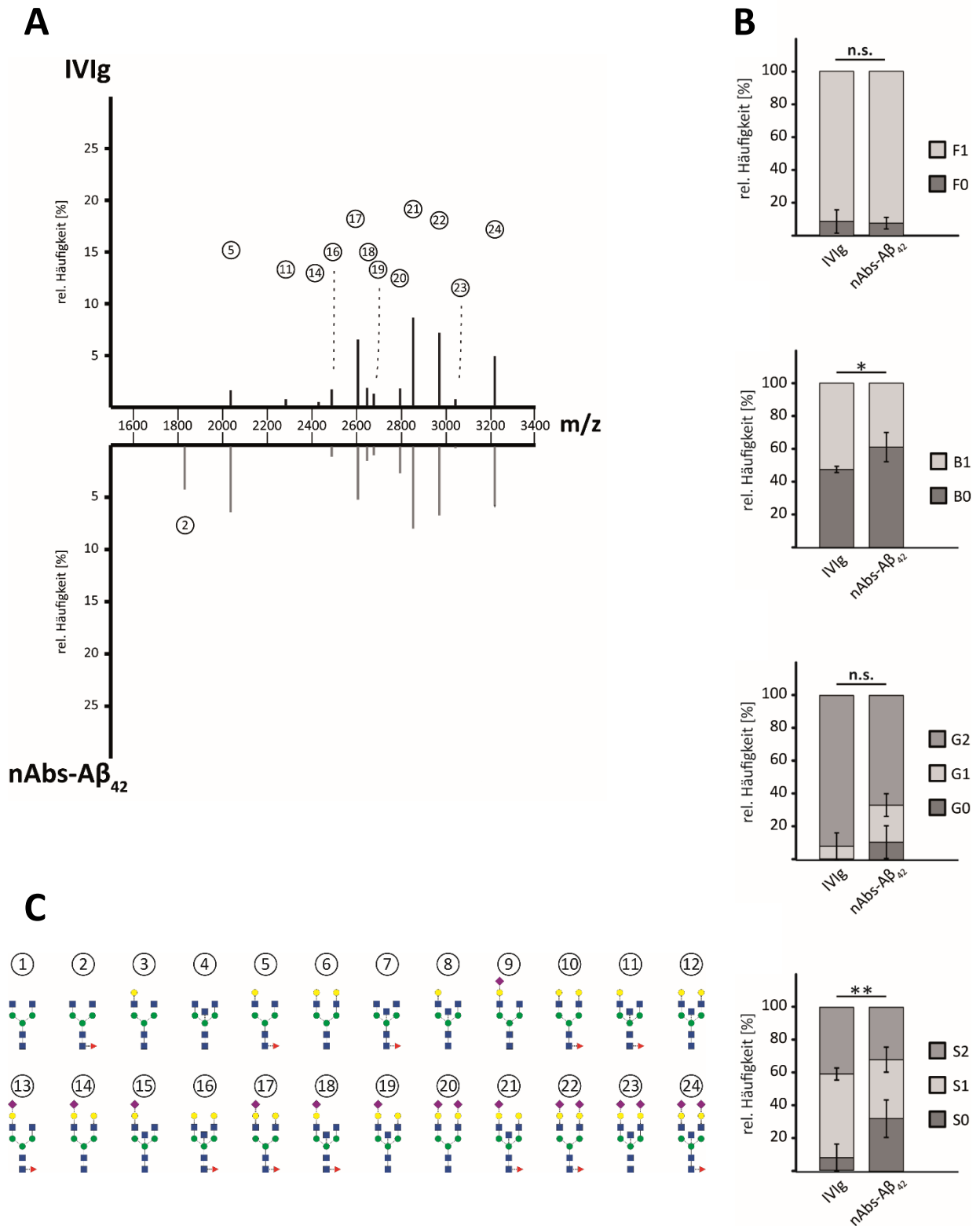


◀ **Abbildung 3.5. Fc N-Glykosylierungsmuster von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>.** **A.** Mittlere Massenspektren der Fc-assoziierten Glykane von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>. Jeder Peak repräsentiert einen Glykan bestimmter Zusammensetzung und konnte über die spezifische Masse ( $m$ )/Ladung ( $z$ ) (X-Achse) als Messgröße der MALDI-TOF-basierten Massenspektrometrie ermittelt werden. Die Peakintensitäten wurden auf die jeweilige Gesamtintensität normiert, um die relative Häufigkeit der einzelnen Glykane (Y-Achse) darstellen zu können. **B.** Zusammenschluss der Fc N-Glykane hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur enthaltenen Zuckermoleküle. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von Oligosacchariden mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zwischen IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> verglichen. **C.** Zusammensetzung aller 24 möglichen Glykane: blaues Quadrat = GlcNAc, rotes Dreieck = Fuc, grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Gal, violette Raute = Neu5Ac.

Zusätzlich zum Fc wurde auch das Fab N-Glykosylierungsmuster von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> untersucht. Hier ergab sich in beiden Fällen ein im Vergleich zum jeweiligen Fc N-Glykosylierungsmuster divergentes Bild. Die Signalintensitäten der Fab-assoziierten N-Glykane waren insgesamt deutlich geringer, sodass lediglich maximal zwölf von 24 möglichen Glykanen gefunden werden konnten und diese darüber hinaus zumeist von größerer Struktur waren (Abb. 3.6, A+C; Tab. 3.1). Vor allem sialylierte Glykane waren am Fab-Fragment deutlich häufiger nachzuweisen als am Fc-Fragment. Diese grundverschiedenen Muster der Fc- und Fab-vermittelten N-Glykosylierung können auch durch statistische Vergleiche belegt und dem Anhang entnommen werden (Tab. A1).

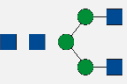








Obwohl die Fab-vermittelten N-Glykosylierungsmuster von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> ein sehr ähnliches Bild ohne signifikant unterschiedliche Häufigkeiten einzelner Glykane zeichnen, konnte in den Mustern mindestens ein Glykan detektiert werden, welcher im jeweils anderen fehlte (Abb. 3.6, A+C; Tab. 3.1). Während IVIg kein Glykan Nr. 2 zeigte, fehlten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> die Glykane Nr. 11 und 14.

Der Zusammenschluss von Fab N-Glykanen zu Gruppen mit bestimmten zusätzlichen Zuckern lieferte hingegen größere Unterschiede, wobei diese nur bei der N-Acetylglucosaminierung und bei der Sialylierung signifikant waren (Abb. 3.2, B; Tab. 3.6). Fab N-Glykane von IVIg wiesen sowohl einen höheren Anteil einfach sialylierter Glykane ( $p = 0,005$ ), als auch einen höheren Anteil Glykane mit zusätzlichem b-GlcNAc auf ( $p = 0,014$ ) (Abb. 3.6, B; Tab. 3.2; Tab. A1).

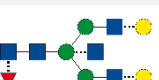



◀ **Abbildung 3.6. Fab N-Glykosylierungsmuster von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>.** **A.** Mittlere Massenspektren der Fab-assoziierten Glykane von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>. Jeder Peak repräsentiert einen Glykan bestimmter Zusammensetzung und konnte über die spezifische Masse ( $m$ )/Ladung ( $z$ ) (X-Achse) als Messgröße der MALDI-TOF-basierten Massenspektrometrie ermittelt werden. Die Peakintensitäten wurden auf die jeweilige Gesamtintensität normiert, um die relative Häufigkeit der einzelnen Glykane (Y-Achse) darstellen zu können. **B.** Zusammenschluss der Fab N-Glykane hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur enthaltenen Zuckermoleküle. Dabei wurden Fab N-Glykane mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zwischen IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> verglichen. **C.** Zusammensetzung aller 24 möglichen Glykane: blaues Quadrat = GlcNAc, rotes Dreieck = Fuc, grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Gal, violette Raute = Neu5Ac.

**Tabelle 3.1. Relative Häufigkeiten der Fc- und Fab-assoziierten N-Glykane von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>.** Dargestellt sind die Nummerierung, die schematische Struktur (blaues Quadrat = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), rotes Dreieck = Fucose (Fuc), grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Galaktose (Gal), violette Raute = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)), die IUPAC Nomenklatur (F = Fuc, A = GlcNAc, B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Gal, S = Neu5Ac) sowie die relativen Häufigkeiten der Glykane als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Struktur	IUPAC	rel. Häufigkeit [%]			
		IVIg		nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>	
		Fc	Fab	Fc	Fab
① 	A2G0	1,1 $\pm$ 0,8	0	2,3 $\pm$ 0,3	0
② 	FA2G0	20,2 $\pm$ 2,9	0	23,3 $\pm$ 3,0	4,2 $\pm$ 6,5
③ 	A2G1	7,2 $\pm$ 1,4	0	7,1 $\pm$ 2,6	0
④ 	A2BG0	0,2 $\pm$ 0,3	0	0,5 $\pm$ 0,2	0
⑤ 	FA2G1	29,4 $\pm$ 3,8	1,5 $\pm$ 3,0	31,0 $\pm$ 2,2	6,4 $\pm$ 0,9
⑥ 	A2G2	8,5 $\pm$ 2,4	0	7,1 $\pm$ 3,8	0
⑦ 	FA2BG0	3,0 $\pm$ 1,1	0	2,9 $\pm$ 0,7	0
⑧ 	A2BG1	1,3 $\pm$ 0,5	0	1,1 $\pm$ 0,5	0
⑨ 	A2G1S1	0,1 $\pm$ 0,1	0	0,1 $\pm$ 0,2	0



⑩		FA2G2	$12,6 \pm 2,4$	0	$11,4 \pm 3,7$	0
⑪		FA2BG1	$2,7 \pm 0,5$	$0,6 \pm 1,3$	$3,4 \pm 1,1$	0
⑫		A2BG2	$0,8 \pm 0,5$	0	$0,6 \pm 0,5$	0
⑬		FA2G1S1	$1,3 \pm 0,4$	0	$1,2 \pm 0,3$	0
⑭		A2G2S1	$0,5 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,6$	0
⑮		A2BG1S1	0	0	$0,1 \pm 0,3$	0
⑯		FA2BG2	$0,2 \pm 0,2$	$1,6 \pm 1,7$	$0,2 \pm 0,3$	$1,0 \pm 1,4$
⑰		FA2G2S1	$4,8 \pm 1,2$	$6,4 \pm 2,4$	$3,8 \pm 1,0$	$5,2 \pm 1,6$
⑱		FA2BG1S1	0	$1,7 \pm 1,6$	0	$1,4 \pm 1,7$
⑲		A2BG2S1	0	$1,2 \pm 1,8$	0	$0,8 \pm 1,1$
⑳		A2G2S2	0	$1,7 \pm 1,4$	0	$2,6 \pm 1,1$
㉑		FA2BG2S1	0	$8,4 \pm 3,3$	0	$8,0 \pm 3,5$
㉒		FA2G2S2	0	$7,0 \pm 2,6$	0	$6,7 \pm 2,6$
㉓		A2BG2S2	0	$0,6 \pm 0,9$	0	$0,2 \pm 0,4$
㉔		FA2BG2S2	0	$4,8 \pm 2,0$	0	$5,8 \pm 2,4$

**Tabelle 3.2. Relative Häufigkeiten der Fc- und Fab-assozierten N-Glykane von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> nach Zusammenschluss hinsichtlich zusätzlich zur Kernstruktur enthaltener Zucker.** N-Glykane mit (F1) oder ohne (F0) Fucose, mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure wurden zusammengefasst und die relativen Häufigkeiten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

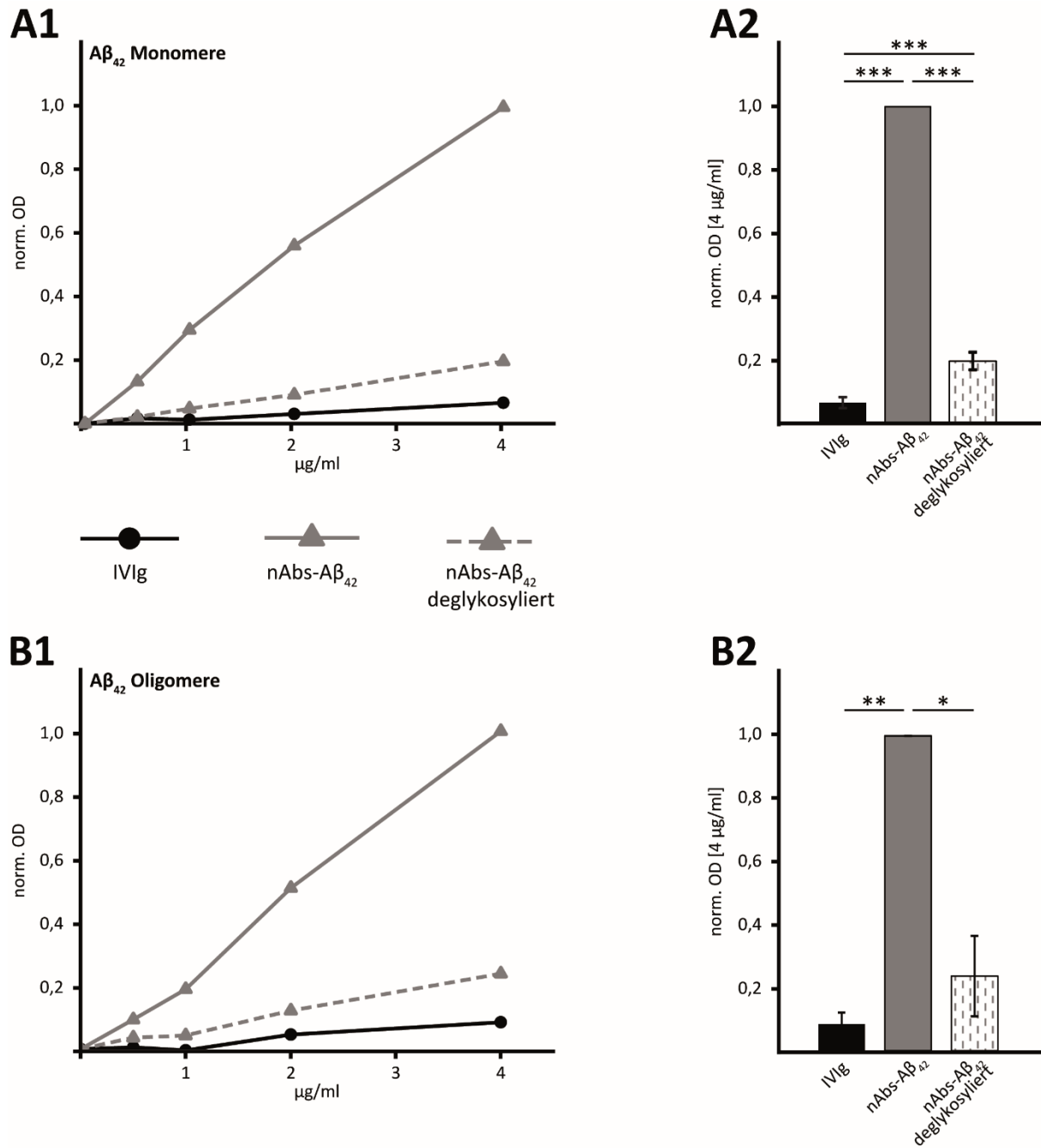
	rel. Häufigkeit [%]			
	IVIg		nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>	
	Fc	Fab	Fc	Fab
<b>F0</b>	21,1 $\pm$ 3,7	8,6 $\pm$ 7,1	20,3 $\pm$ 8,8	7,6 $\pm$ 3,5
<b>F1</b>	78,9 $\pm$ 3,7	91,4 $\pm$ 7,1	79,7 $\pm$ 8,8	92,4 $\pm$ 3,5
<b>B0</b>	91,2 $\pm$ 2,2	47,4 $\pm$ 1,9	90,8 $\pm$ 1,6	61,1 $\pm$ 8,9
<b>B1</b>	8,8 $\pm$ 2,2	52,6 $\pm$ 1,9	9,2 $\pm$ 1,6	38,9 $\pm$ 8,9
<b>G0</b>	26,0 $\pm$ 3,0	0	29,9 $\pm$ 2,8	10,7 $\pm$ 10
<b>G1</b>	44,9 $\pm$ 1,2	7,8 $\pm$ 8,1	45,6 $\pm$ 1,4	22,5 $\pm$ 6,9
<b>G2</b>	29,1 $\pm$ 2,6	92,2 $\pm$ 8,1	24,5 $\pm$ 1,8	66,7 $\pm$ 9,1
<b>S0</b>	92,9 $\pm$ 1,6	7,7 $\pm$ 8,3	94,0 $\pm$ 1,8	32,2 $\pm$ 11,4
<b>S1</b>	7,1 $\pm$ 1,6	51,3 $\pm$ 3,7	6,0 $\pm$ 1,8	36,0 $\pm$ 7,7
<b>S2</b>	0	40,9 $\pm$ 7,1	0	31,9 $\pm$ 3,8

### 3.3 Funktioneller Einfluss der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> Glykosylierung

Nach erfolgreicher Charakterisierung des N-Glykosylierungsmusters der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> sollte anhand umfangreicher Analysen der funktionelle Einfluss der Glykane auf den Wirkmechanismus der Autoantikörper untersucht werden. Hierfür wurden nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> enzymatisch deglykosyliert und die dadurch hervorgerufenen Effekte auf jene Antikörper-basierten Prozesse untersucht, welche im Rahmen der Alzheimer-Krankheit protektive Funktionen einnehmen könnten.

#### 3.3.1 Antigenbindung und Aggregation

Zunächst sollte überprüft werden, ob und inwiefern der N-Glykosylierung der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> eine entscheidende Rolle zur Antigenbindung als Grundlage aller funktionellen Prozesse zukommt. Mithilfe von Konzentrationsreihen wurde in ELISA-Experimenten die Bindung von glykosylierten und deglykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> sowie IVIg an A $\beta$ <sub>42</sub> kontrolliert, wobei zwischen der monomeren und oligomeren Peptidform unterschieden wurde (Abb. 3.7). In beiden Fällen erfolgte eine Normierung der Ergebnisse auf die von 4  $\mu$ g/ml nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> erzeugte OD, um die Bindungskurven miteinander vergleichen zu können. Die stärkste Bindung sowohl an A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomere (Abb. 3.7, A) als auch an A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere (Abb. 3.7, B) war für die glykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> nachzuweisen. Deglykosylierte nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> (Monomere:  $0,197 \pm 0,028$ , Oligomere:  $0,237 \pm 0,128$ ) sowie IVIg (Monomere:  $0,066 \pm 0,017$ , Oligomere:  $0,084 \pm 0,036$ ) zeigten eine deutlich reduzierte OD, welche mithilfe der jeweils höchsten Antikörperkonzentration statistisch belegt werden konnte (Abb. 3.7, A2+B2). Bei den A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomere zeigten sich zwischen allen drei Antikörperproben höchst signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ), während bei A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomeren nur zwischen (de)glykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> ( $p = 0,015$ ) sowie zwischen nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> und IVIg ( $p = 0,008$ ) signifikante Unterschiede in der Bindung offenbart wurden.



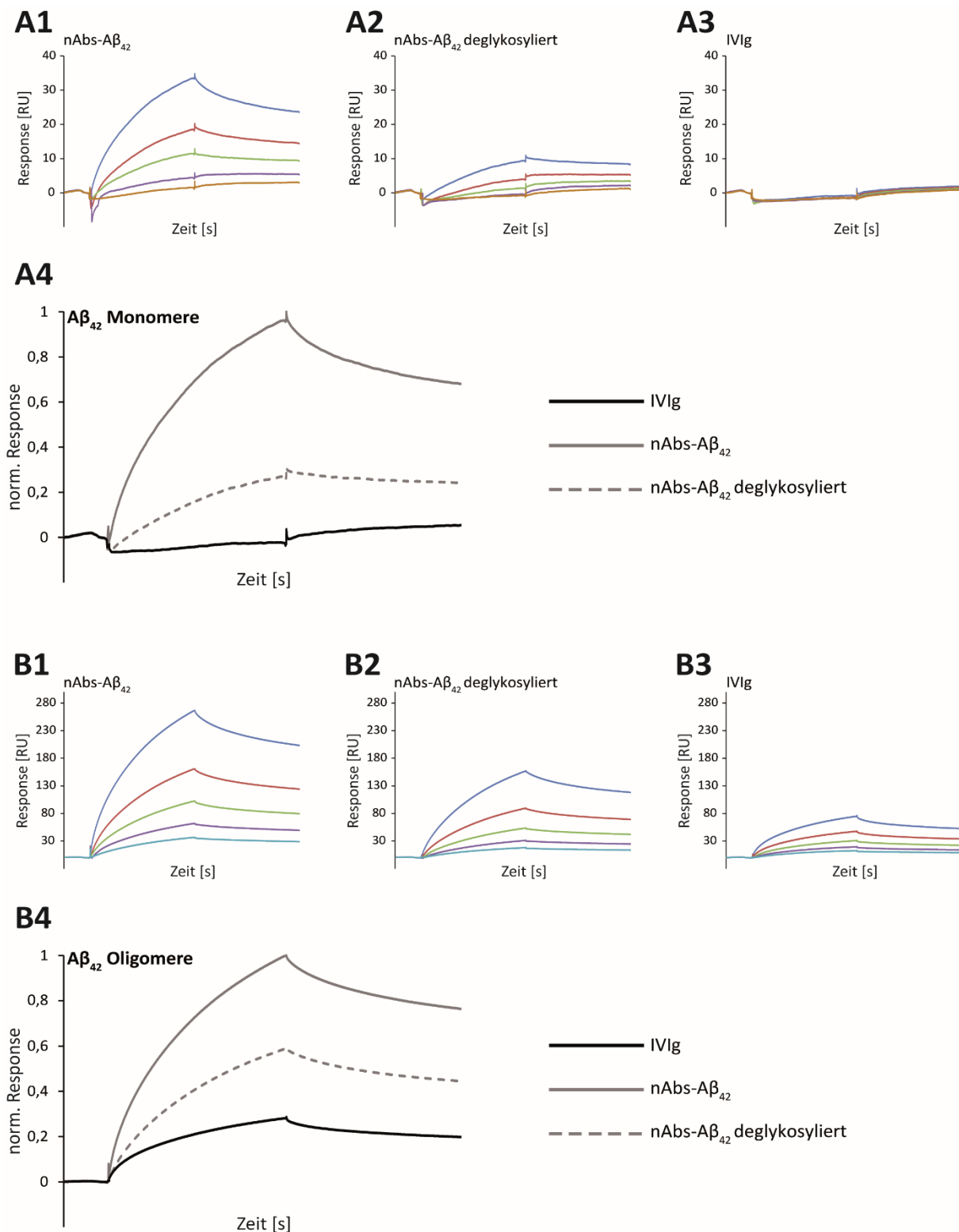
**Abbildung 3.7. ELISA-vermittelte Bindungsanalysen an Aβ<sub>42</sub>.** Die Bindung von (de)glykosylierten nAbs-Aβ<sub>42</sub> sowie IVIg an Aβ<sub>42</sub>-Monomere (**A1**) und -Oligomere (**B1**) wurde anhand von Konzentrationsreihen, ausgehend von 4 µg/ml Antikörper getestet. Dabei erfolgte stets die Normierung der Daten auf die durch 4 µg/ml glykosylierte nAbs-Aβ<sub>42</sub> hervorgerufene OD. Um die Bindung der verschiedenen Antikörperproben an Aβ<sub>42</sub>-Monomere (**A2**) und -Oligomere (**B2**) statistisch miteinander zu vergleichen, wurden die ODs der 4 µg/ml Messungen herangezogen.

Mittels SPR Spektroskopie konnten die Ergebnisse der ELISA-Experimente verifiziert werden (Abb. 3.8). Darüber hinaus war es mithilfe dieser Technik möglich, ein genaueres Bild der Bindungskinetiken und -affinitäten zu gewinnen, indem durch absteigende Konzentrationen glykosylierter und deglykosylierter nAbs-A $\beta_{42}$  sowie IVIg die Bindungskurven an A $\beta_{42}$ -Monomere (Abb. 3.8, A1-A3) und A $\beta_{42}$ -Oligomere (Abb. 3.8, B1-B3) aufgezeichnet wurden. Für beide Peptidformen zeigten jeweils glykosylierte nAbs-A $\beta_{42}$  die höchsten Response Units (RUs) als Maß für die Anzahl gebundener Antikörper, gefolgt von deglykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  (Abb. 3.8, A1-B2). IVIg vermittelte bei A $\beta_{42}$ -Monomeren keine auswertbare und bei A $\beta_{42}$ -Oligomeren eine nur sehr schwache Bindung (Abb. 3.8, A3+B3). Der direkte Vergleich der jeweils höchsten Antikörperkonzentration nach Normierung auf die maximalen RUs von nAbs-A $\beta_{42}$  offenbarte für A $\beta_{42}$ -Monomere (Abb. 3.8, A4) bzw. -Oligomere (Abb. 3.8, B4) eine reduzierte Response von 0,314 bzw. 0,590 für deglykosylierte nAbs-A $\beta_{42}$  und 0,055 bzw. 0,286 für IVIg. Diese unterschiedlichen Bindungen spiegelten sich auch in einer flacheren Assoziationskurve wider.

Ein direkter Vergleich der Bindungen an A $\beta_{42}$ -Monomere und -Oligomere anhand der RUs ist in diesem Falle nicht möglich, da unterschiedliche Mengen Peptid auf dem Sensorchip immobilisiert wurden (Monomere: 2833 RUs, Oligomere: 4770 RUs). Um die Bindungskinetiken bzw. -affinitäten zu den beiden Peptidformen dennoch miteinander vergleichen zu können, wurde der  $K_D$ -Wert als Maß für die Affinität nach Fitten mit dem steady-state affinity Modell herangezogen. In Übereinstimmung mit den bereits dargelegten Resultaten, wurden sowohl für A $\beta_{42}$ -Monomere als auch -Oligomere die glykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  als affiner identifiziert als ihr deglykosyliertes Pendant (Tab. 3.3.). Interessanterweise zeigte jedoch die Bindung von IVIg an A $\beta_{42}$ -Oligomere eine noch höhere Affinität, während die Bindung an A $\beta_{42}$ -Monomere dahingehend nicht auszuwerten war.

**Tabelle 3.3.  $K_D$ -Werte und maximale RUs.** Dargestellt sind die durch den steady-state affinity Modell Fit berechneten  $K_D$ -Werte sowie die durch die höchste Antikörperkonzentration hervorgerufenen, maximalen RUs nach Bindung von (de)glykosylierten nAbs- $A\beta_{42}$  und IVIg an  $A\beta_{42}$ -Monomere und -Oligomere. N.a. = nicht auswertbar.

	<b><math>A\beta_{42}</math>-Monomere</b>		<b><math>A\beta_{42}</math>-Oligomere</b>	
	$K_D$ -Wert [M]	$R_{Max}$ (RU)	$K_D$ -Wert [M]	$R_{Max}$ (RU)
<b>IVIg</b>	n.a.	1,9	$1,7 \times 10^{-6}$	76,4
<b>nAbs-<math>A\beta_{42}</math></b>	$2,0 \times 10^{-6}$	34,8	$2,2 \times 10^{-6}$	266,6
<b>nAbs-<math>A\beta_{42}</math> deglykosyliert</b>	$1,9 \times 10^{-5}$	10,9	$3,7 \times 10^{-6}$	157,3

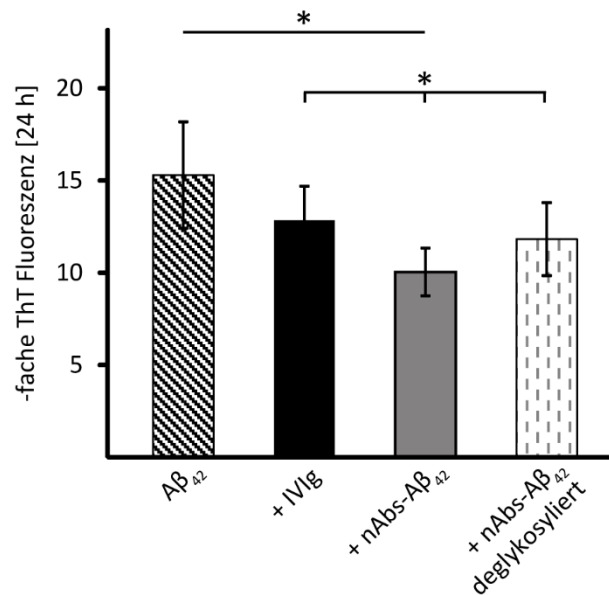


**Abbildung 3.8. Bindungsanalysen an A $\beta_{42}$  mittels SPR.** Die Bindung von glykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  (1), deglykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  (2) sowie IVIg (3) an A $\beta_{42}$ -Monomere (A) und -Oligomere (B) wurde anhand von Konzentrationsreihen über die Zeit untersucht: dunkelblau = 150  $\mu\text{g/ml}$ , rot = 75  $\mu\text{g/ml}$ , grün = 37,5  $\mu\text{g/ml}$ , violett = 18,75  $\mu\text{g/ml}$ , hellblau = 9,375  $\mu\text{g/ml}$ . Dabei kann zwischen einer Start-, einer Assoziations- und einer Dissoziationsphase unterschieden werden. Um die Bindung der verschiedenen Antikörperproben an A $\beta_{42}$ -Monomere (A4) und -Oligomere (B4) direkt miteinander zu vergleichen, wurden die RUs der jeweils 150  $\mu\text{g/ml}$  Bindungskurve auf die maximale Response von nAbs-A $\beta_{42}$  normiert.

Aufgrund der im ELISA und SPR ermittelten Bindecharakteristika der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>, wurde in einem nachfolgenden Schritt überprüft, ob die Autoantikörper einen inhibitorischen Einfluss auf die A $\beta$ <sub>42</sub>-Aggregation innehaben und ob dieser Effekt nach der Deglykosylierung aufgehoben oder herabgesetzt ist. Hierzu wurde das monomere Peptid in An- bzw. Abwesenheit von (de)glykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> sowie IVIg inkubiert und die Emission bei 482 nm nach Zugabe von ThT gemessen. Eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität als Indikator für die Bildung von  $\beta$ -Faltblättern konnte dadurch indirekt zur Quantifizierung der Aggregation herangezogen werden.

Nach 24 h Inkubation konnte für A $\beta$ <sub>42</sub> eine Fluoreszenzzunahme um den Faktor  $15,3 \pm 2,9$  nachgewiesen werden (Abb. 3.9). In allen Fällen führte die simultane Inkubation mit Antikörpern zu einer Abschwächung dieses Effektes, sodass mit IVIg eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um den Faktor  $12,8 \pm 1,8$ , mit glykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> um den Faktor  $10,0 \pm 1,3$  und mit deglykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> um den Faktor  $11,8 \pm 2,0$  ermittelt wurde. Die größte und gleichzeitig einzig signifikante Reduktion der Fluoreszenzzunahme konnte dabei mit glykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> erzielt werden ( $p = 0,045$ ). Gleichzeitig zeigten glykosylierte nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> eine signifikant stärkere Abschwächung der Fluoreszenzzunahme als deglykosylierte nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> ( $p = 0,050$ ) oder IVIg ( $p = 0,013$ ) und letztere untereinander ebenfalls signifikante Unterschiede ( $p = 0,036$ ).





**Abbildung 3.9. Inhibition der Aβ<sub>42</sub>-Aggregation.** Aβ<sub>42</sub> wurde ohne oder mit Zugabe von IVIg, glykosylierten nAbs-Aβ<sub>42</sub> oder deglykosylierten nAbs-Aβ<sub>42</sub> inkubiert. Nach 0 und 24 h erfolgte die Zugabe von ThT mit anschließender Fluoreszenzmessung bei 482 nm. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität spiegelt indirekt die Aggregation von Aβ<sub>42</sub> wider.

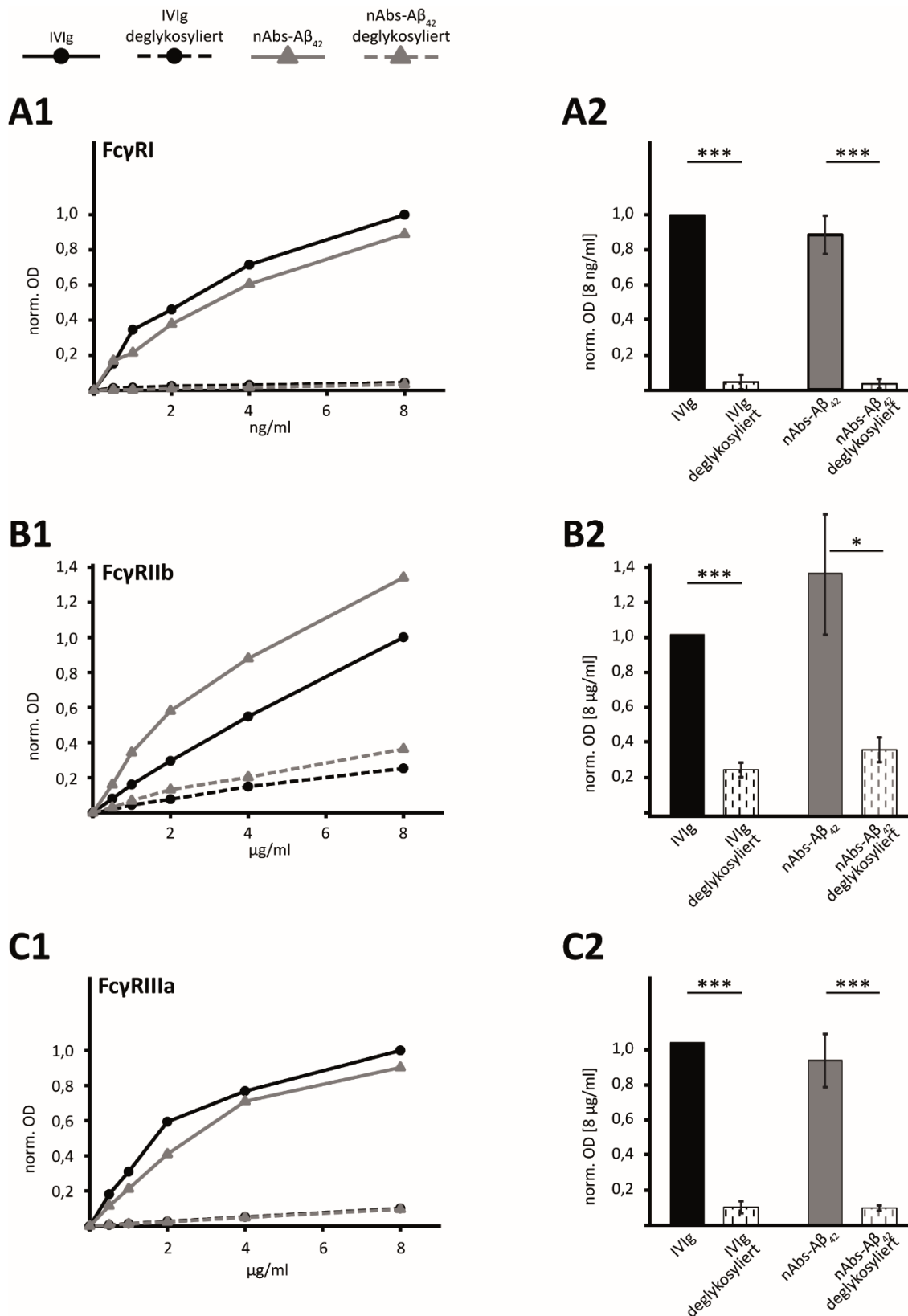
### 3.3.2 Bindung an Effektorstrukturen

Nach der Charakterisierung der vom Fab-Fragment vermittelten Antigenbindung, stellten Untersuchungen Fc-Fragment-induzierter Interaktionen und eine potentielle Abhängigkeit von der N-Glykosylierung die nächsten Schritte dar. Hierzu wurden ELISA-Experimente durchgeführt, mit deren Hilfe Bindungsanalysen an typische Rezeptoren und Interaktionspartner von IgG, darunter FcγRI, FcγRIIb und FcγRIIIa sowie das initiale Komplementprotein C1q und der alternative IgG-Rezeptor DC-SIGN, ermöglicht wurden. Für die Vergleichbarkeit der Daten wurden die Messungen stets auf die OD der jeweils höchsten IVIg Konzentration normiert.

Die Bindung an FcγR folgte in allen Fällen einem nahezu identischen Schema (Abb. 3.10). Während IVIg und nAbs-Aβ<sub>42</sub> in hohem Maße und in der Regel vergleichbar mit den Rezeptoren interagierten, führte die Deglykosylierung bei beiden Antikörpern zu einem erheblichen Affinitätsverlust, welcher sich im Falle des FcγRI sogar in einer nahezu aufgehobenen Bindung äußerte (Abb. 3.10, A1, B1, C1). Diese Differenzen konnten unter anderem anhand der normierten ODs der maximal eingesetzten Antikörperkonzentrationen statistisch belegt werden (Abb. 3.10, A2, B2, C2).

Dabei zeigten IVIg bzw. nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> nach Deglykosylierung im Fc $\gamma$ RI ELISA eine verringerte OD auf  $0,043 \pm 0,042$  ( $p \leq 0,001$ ) bzw.  $0,033 \pm 0,028$  ( $p \leq 0,001$ ), im Fc $\gamma$ RIIb ELISA eine verringerte OD auf  $0,252 \pm 0,040$  ( $p \leq 0,001$ ) bzw.  $0,363 \pm 0,068$  ( $p = 0,012$ ) und im Fc $\gamma$ RIIIa ELISA eine verringerte OD auf  $0,010 \pm 0,033$  ( $p \leq 0,001$ ) bzw.  $0,096 \pm 0,015$  ( $p = 0,001$ ).

Sowohl der Fc $\gamma$ RI als auch der Fc $\gamma$ RIIb ELISA wiesen jedoch auch Besonderheiten bei der Versuchsdurchführung bzw. den Resultaten auf. Bei ansonsten identischem Versuchsablauf konnten die Antikörper im Fc $\gamma$ RI ELISA um den Faktor 1000 geringer konzentriert eingesetzt werden erzielten dennoch zu den anderen ELISAs vergleichbare ODs. Beim Fc $\gamma$ RIIb ELISA fanden sich gegenüber IVIg erhöhte Affinitäten der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> wieder, welche anhand der normierten ODs der maximalen Antikörperkonzentrationen zwar keinen (Abb. 3.10, B2), jedoch innerhalb der nachfolgenden Konzentrationsreihe durchaus signifikante Unterschiede aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

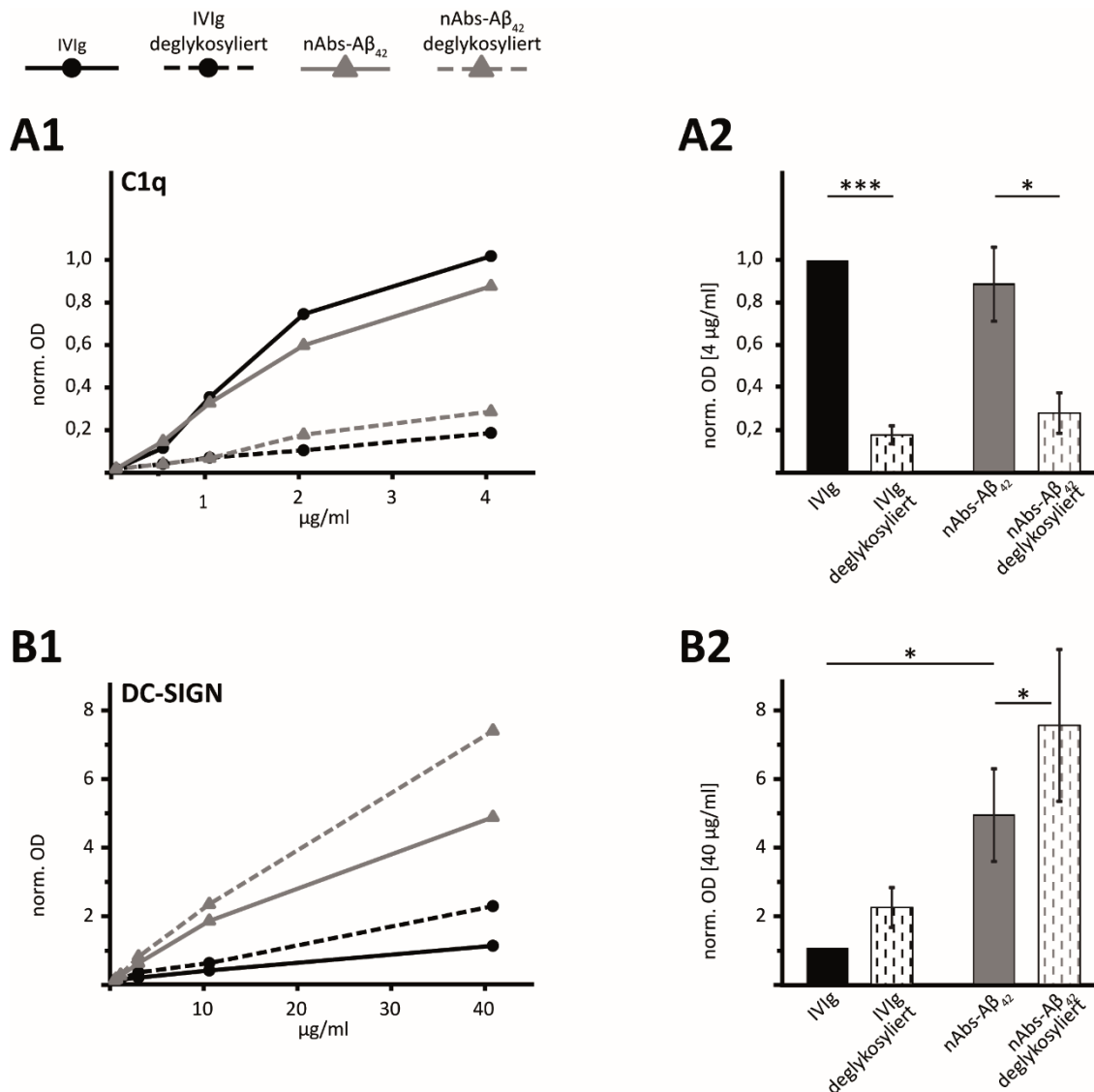


**Abbildung 3.10. ELISA-vermittelte Bindungsanalysen an Fc $\gamma$ R.** Die Bindung von (de)glykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  sowie (de)glykosylierten IVIg an Fc $\gamma$ RI (A1), Fc $\gamma$ RIIb (B1) und Fc $\gamma$ RIIIa (C1) wurde anhand von Konzentrationsreihen, ausgehend von 8 ng/ml bzw. 8 µg/ml Antikörper getestet. Dabei erfolgte stets die Normierung der Daten auf die durch die maximale IVIg Konzentration hervorgerufene OD. Um die Bindung der verschiedenen Antikörperproben an Fc $\gamma$ RI (A2), Fc $\gamma$ RIIb (B2) und Fc $\gamma$ RIIIa (C2) statistisch miteinander zu vergleichen, wurden die ODs der 8 ng/ml bzw. 8 µg/ml Messungen herangezogen.

Neben FcγR wurden auch das Komplementprotein C1q sowie DC-SIGN hinsichtlich der Bindung von IVIg und nAbs-Aβ<sub>42</sub> mit und ohne N-Glykosylierung untersucht. Dabei ergab sich für C1q ein ähnliches Bild wie für die FcγR. IVIg und nAbs-Aβ<sub>42</sub> zeigten eine hohe und vergleichbare, die deglykosylierten Antikörper erneut eine signifikant reduzierte Affinität zum Interaktionspartner, jeweils aufgezeigt durch die normierte OD der maximalen Antikörperkonzentration (IVIg:  $0,168 \pm 0,042$ ,  $p = 0,001$ ; nAbs-Aβ<sub>42</sub>:  $0,269 \pm 0,092$ ,  $p = 0,014$ ) (Abb. 3.11, A1+A2).

Demgegenüber konnte für die DC-SIGN Bindung ein konträrer Effekt der Deglykosylierung identifiziert werden (Abb. 3.11, B1+B2). Sowohl IVIg als auch nAbs-Aβ<sub>42</sub> offenbarten nach Abspaltung der Zuckerketten eine erhöhte OD und somit Affinität an DC-SIGN (IVIg:  $2,2 \pm 0,6$ ; nAbs-Aβ<sub>42</sub>:  $7,3 \pm 2,1$ ), wobei dieser Effekt bei den Autoantikörpern stärker repräsentiert war und dadurch einen signifikanten Unterschied verursachte ( $p = 0,049$ ). Auch konnten bereits zwischen den glykosylierten Antikörpern unterschiedliche Bindungen an DC-SIGN festgestellt werden. Für die nAbs-Aβ<sub>42</sub> zeigte sich eine gegenüber IVIg signifikant erhöhte OD auf  $4,7 \pm 1,3$  ( $p = 0,028$ ).

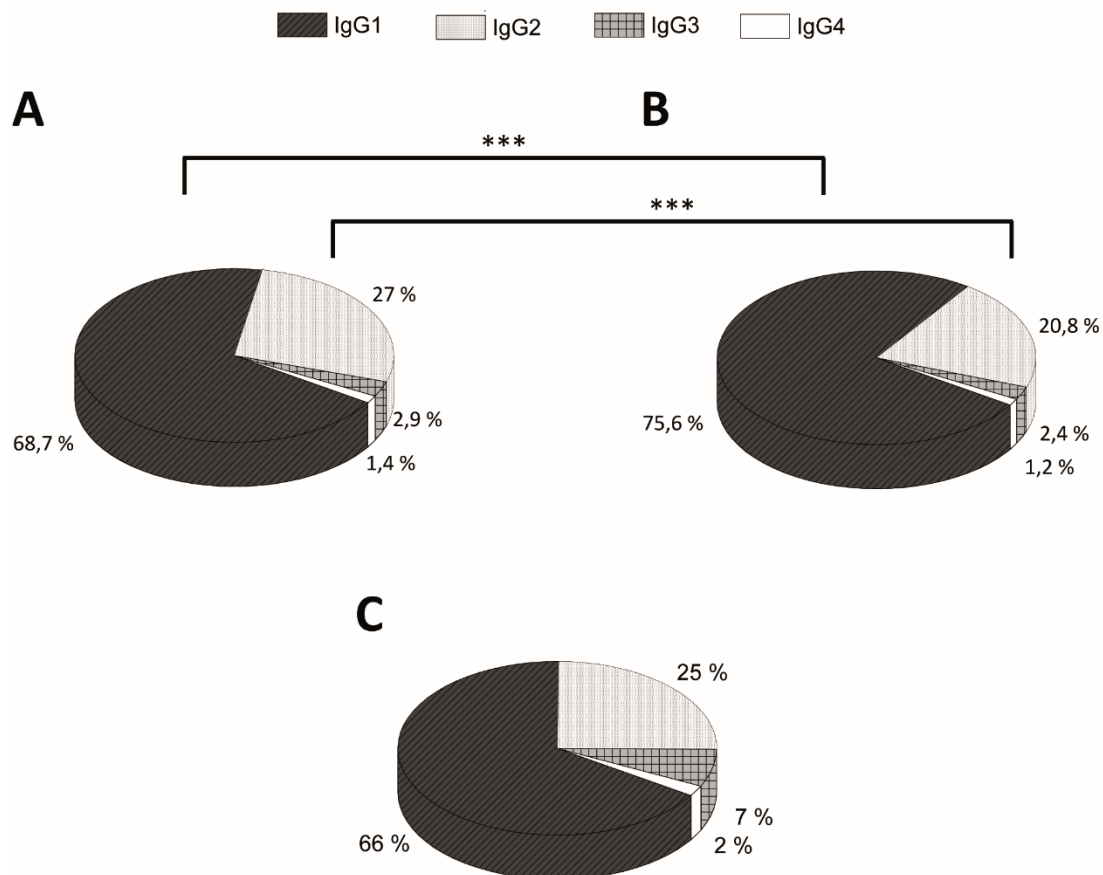
Während der FcγRI ELISA bereits mit 8 ng/ml und die FcγRIIb und FcγRIIIa ELISAs mit 8 µg/ml entwickelt werden konnten, mussten für eine nachweisbare Bindung im DC-SIGN ELISA bis zu 40 µg/ml Antikörper eingesetzt werden.



**Abbildung 3.11. ELISA-vermittelte Bindungsanalysen an C1q und DC-SIGN.** Die Bindung von (de)glykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  sowie (de)glykosylierten IVIg an C1q (**A1**) und DC-SIGN (**B1**) wurde anhand von Konzentrationsreihen, ausgehend von 4 µg/ml bzw. 40 µg/ml Antikörper getestet. Dabei erfolgte stets die Normierung der Daten auf die durch die maximale IVIg Konzentration hervorgerufene OD. Um die Bindung der verschiedenen Antikörperproben an C1q (**A2**) und DC-SIGN (**B2**) statistisch miteinander zu vergleichen, wurden die ODs der 4 µg/ml bzw. 40 µg/ml Messungen herangezogen.

Aufgrund der unterschiedlichen Bindungscharakteristika von IVIg und nAbs-A $\beta_{42}$  an die verschiedenen Interaktionspartner wurden weiterhin nephelometrische Untersuchungen angestellt. Hierbei war die Bestimmung der Verteilung der IgG-Subtypen als ein entscheidender Faktor der Bindung an Effektorstrukturen das Ziel. Für IVIg konnte eine Verteilung von 68,7 % IgG1, 27 % IgG2, 2,9 % IgG3 und 1,4 % IgG4 festgestellt werden (Abb. 3.12, A).

Demgegenüber stand eine Verteilung von 75,6 % IgG1, 20,8 % IgG2, 2,4 % IgG3 und 1,2 % IgG4 für nAbs-A $\beta_{42}$  (Abb. 3.12, B). Zwischen IgG1 und IgG2 der beiden Antikörpergruppen fanden sich signifikante Unterschiede wieder ( $p \leq 0,001$ ).



**Abbildung 3.12. IgG-Subtypenbestimmung mittels Nephelometrie.** Die Verteilung der IgG-Subtypen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 wurden bei IVIg (A) und nAbs-A $\beta_{42}$  (B) nephelometrisch analysiert. Demgegenüber sind Referenzwerte gezeigt (C).

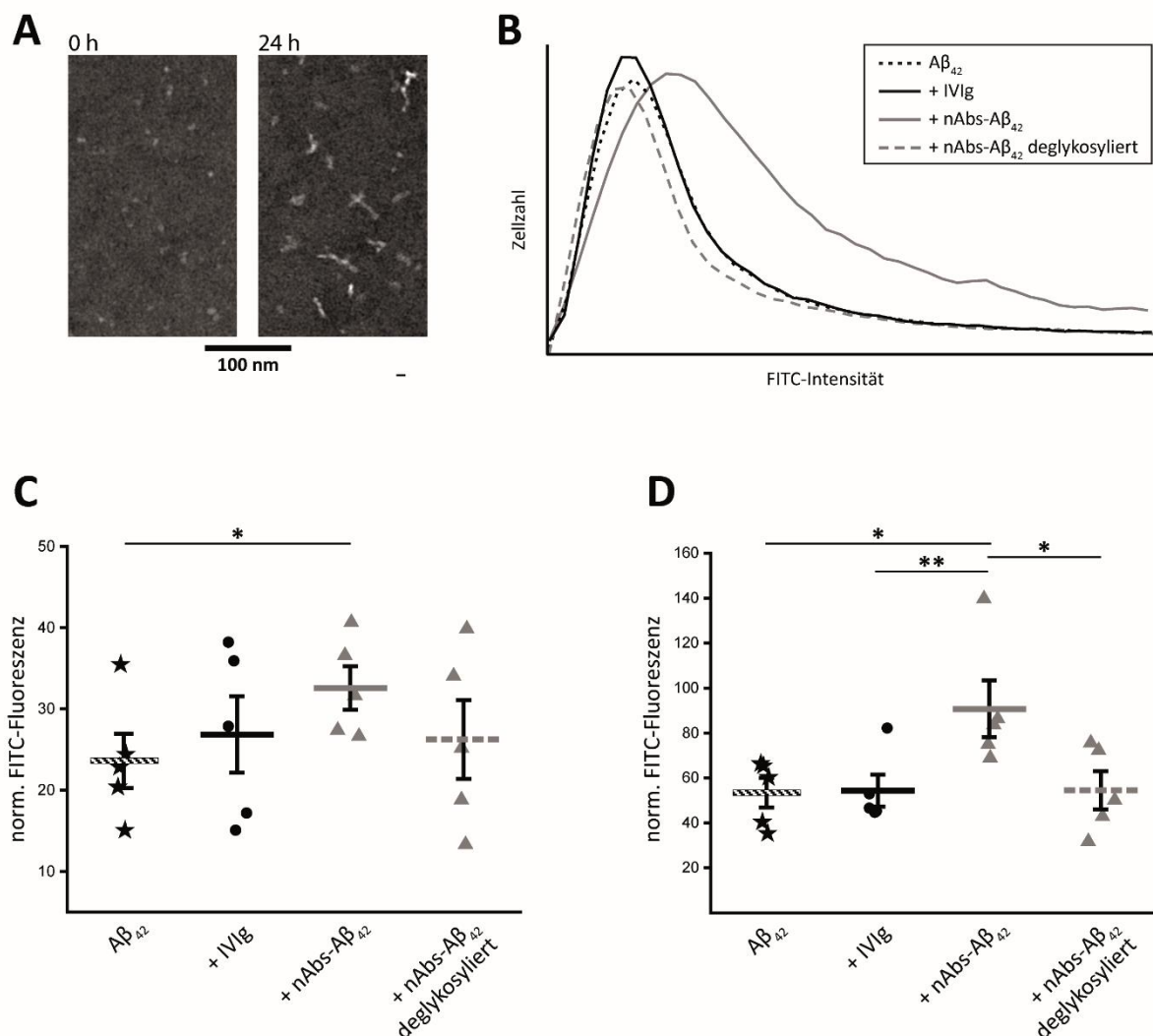
### 3.3.3 Phagozytose

Nach der Charakterisierung der Bindung an A $\beta$ <sub>42</sub> sowie Effektorstrukturen schlossen sich Analysen zu potentiell protektiven Effekten der nAbs auf die Phagozytose und Toxizität von A $\beta$  an. Dabei sollte zunächst mithilfe von BV2 Zellen die mikrogliale Aufnahme von A $\beta$ <sub>42</sub> im Durchflusszytometer untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen mit FITC konjugiertem, monomeren sowie oligomerem Peptid und (de)glykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> oder IVIg inkubiert und anschließend die Phagozytoserate durch Bestimmung der mittleren FITC-Intensität von 40.000 Zellen quantifiziert (Abb. 3.13). Die Normierung der Daten erfolgte anschließend auf die durchflusszytometrische Messung unbehandelter Zellen.

Aufgrund der Fluoreszenzmarkierung von A $\beta$ <sub>42</sub> mussten zunächst ein unverändertes Aggregationsverhalten des Peptids und die erfolgreiche Herstellung von A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomeren verifiziert werden. Letztere konnten mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen erneut nach 24 h nachgewiesen werden (Abb. 3.13, A).

Sowohl für das monomere als auch für das oligomere Peptid zeigte sich die höchste Phagozytoserate für den Ansatz mit glykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> (Abb. 3.13, B-D). Dabei konnten neben einer erhöhten Anzahl FITC-positiver Zellen auch stärkere Fluoreszenzsignale gegenüber den restlichen Bedingungen gemessen werden (Abb. 3.13, B). Während die alleinige Behandlung mit A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren bzw. A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomeren eine normierte FITC-Fluoreszenz von  $23,6 \pm 7,5$  bzw.  $53,4 \pm 14,6$  verursachte, riefen glykosylierte nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> eine signifikant gesteigerte Phagozytose (Monomere:  $p = 0,048$ ; Oligomere:  $p = 0,018$ ) mit einer normierten Fluoreszenz von  $32,6 \pm 6,0$  bzw.  $90,6 \pm 28,3$  hervor (Abb. 3.13, C+D). Demgegenüber führte weder die Verwendung von deglykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> (Monomere:  $26,3 \pm 10,8$ ; Oligomere:  $54,5 \pm 19,0$ ) noch die Verwendung von IVIg (Monomere:  $26,9 \pm 10,5$ ; Oligomere:  $54,3 \pm 15,9$ ) zu einer signifikant gesteigerten Phagozytose. Hier konnten zudem signifikante Unterschiede zwischen glykosylierten und deglykosylierten nAbs ( $p = 0,019$ ) bzw. glykosylierten nAbs und IVIg ( $p = 0,003$ ) für A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere, hingegen nicht für A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomere identifiziert werden.

Die Experimente mit den beiden Peptidformen offenbarten darüber hinaus einen generellen Unterschied in der Fluoreszenz. Zellen, welche mit  $A\beta_{42}$ -Monomeren behandelt wurden, wiesen eine von Grund auf geringere Fluoreszenz auf, als jene Zellen, die mit  $A\beta_{42}$ -Oligomeren inkubiert wurden (Abb. 3.13, C+D). Dies schließt einen direkten Vergleich der Phagozytose von Monomeren und Oligomeren aus.



**Abbildung 3.13. Phagozytose von  $A\beta_{42}$ -Monomeren und -Oligomeren.** BV2 Zellen wurden mit FITC konjugiertem, monomerem oder oligomerem  $A\beta_{42}$  unter Zugabe von (de)glykosylierten nAbs- $A\beta_{42}$  oder IVIg behandelt. Die Phagozytoserate konnte im Anschluss durchflusszytometrisch über die Messung der FITC-Intensität der Zellen quantifiziert werden. **A.** Die Überprüfung der erfolgreichen Herstellung von  $A\beta_{42}$ -Oligomeren nach 24 h Inkubation wurde elektronenmikroskopisch durchgeführt. **B.** Histogramme über die Fluoreszenzintensität FITC-positiver BV2 Zellen einer repräsentativen Messung. **C+D.** Vergleich der mittleren FITC-Fluoreszenz von BV2 Zellen nach Inkubation mit  $A\beta_{42}$ -Monomeren (**C**) bzw. -Oligomeren (**D**) in An- bzw. Abwesenheit von (de)glykosylierten nAbs- $A\beta_{42}$  oder IVIg. Es erfolgte eine Normierung der Daten aus Messungen unbehandelter Zellen.

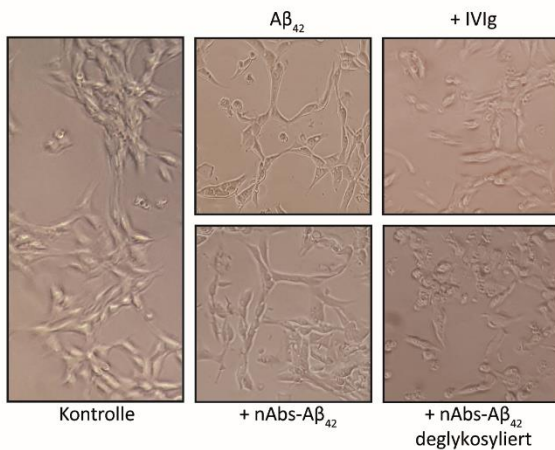
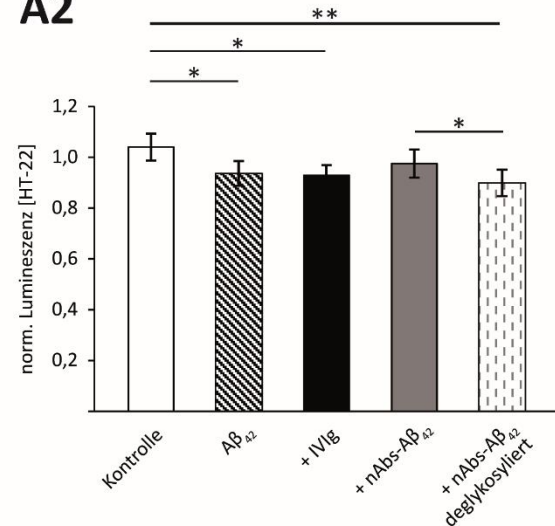
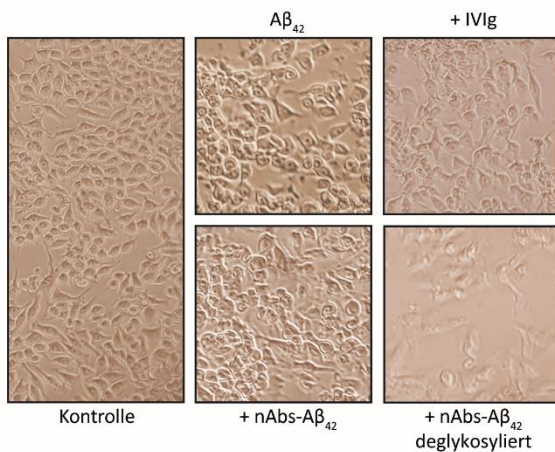
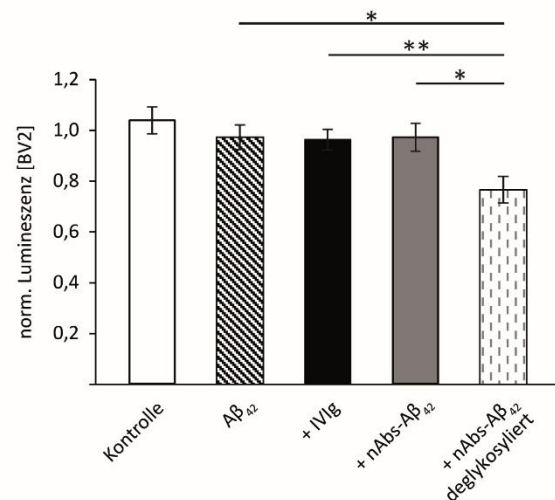


### 3.3.4 Zellviabilität

Neben der Induktion der Phagozytose sollte anhand der Zellviabilität eine weitere potentiell protektive Eigenschaft von nAbs-A $\beta_{42}$  getestet werden. Die Reduktion zytotoxischer Effekte von A $\beta_{42}$ -Monomeren und -Oligomeren auf neuronale bzw. mikrogliale Zellen nach Zugabe der Antikörper stand hierbei im Fokus. HT-22 bzw. BV2 Zellen wurden mit dem jeweiligen reinen Peptid oder in Kombination mit (de)glykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  bzw. IVIg inkubiert und ihre Viabilität indirekt über eine von der ATP-Synthese abhängigen Lumineszenzreaktion bestimmt. Es erfolgte eine Normierung sämtlicher Ansätze auf mit purem Zellkulturmedium inkubierte Zellen. Als Kontrollbedingung wurde Zellkulturmedium, welchem ein den Behandlungsansätzen entsprechendes Volumen PBS zugegeben wurde, gewählt.

Die Behandlung mit A $\beta_{42}$ -Monomeren führte bei HT-22 Zellen zu einer signifikant reduzierten Viabilität ( $p = 0,028$ ), welche mikroskopisch nicht eindeutig, dafür aber über die Messung der Lumineszenz nachzuweisen war (Abb. 3.14, A1+A2). Gegenüber der Kontrollbedingung mit einer normierten Lumineszenz von  $1,040 \pm 0,053$  wurde nach Behandlung mit dem monomeren Peptid ein Wert von  $0,937 \pm 0,049$  bestimmt (Abb. 3.14, A2). Während die Zugabe von IVIg oder deglykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  diesen Effekt nicht aufhob und weiterhin eine signifikant reduzierte Viabilität zu beobachten war (IVIg:  $p = 0,016$ ; deglykosylierte nAbs-A $\beta_{42}$ :  $p = 0,009$ ), konnte bei glykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  durch Erhöhung der normierten Lumineszenz auf  $0,976 \pm 0,055$  ein positiver Einfluss nachgewiesen werden. Dieser Effekt war zudem gegenüber den deglykosylierten Autoantikörpern signifikant ( $p = 0,004$ ).

BV2 Zellen zeigten nach Inkubation mit A $\beta_{42}$ -Monomeren hingegen keine signifikante Reduktion ihrer Viabilität (Abb. 3.13, B1+B2). Eine solche konnte jedoch nach Zugabe von deglykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  identifiziert werden ( $p = 0,013$ ), während glykosylierte nAbs-A $\beta_{42}$  bzw. IVIg keinen Einfluss auf den Lebendzellanteil hatten (Abb. 3.13, B2). Die gemessene normierte Lumineszenz lag bei  $0,974 \pm 0,060$  für A $\beta_{42}$ -Monomere und bei  $0,961 \pm 0,091$ ,  $0,971 \pm 0,062$  bzw.  $0,767 \pm 0,109$  für die Ansätze mit IVIg bzw. (de)glykosylierten nAbs.

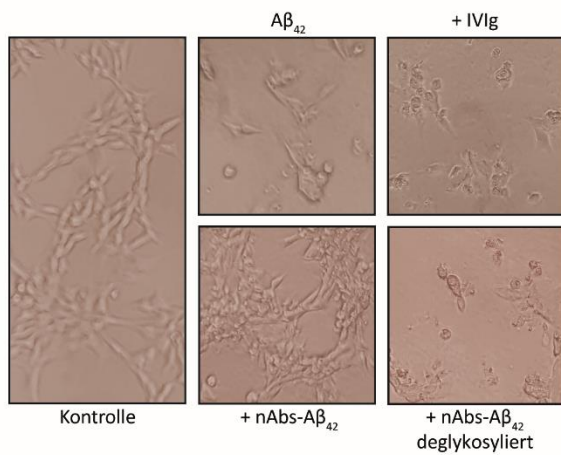
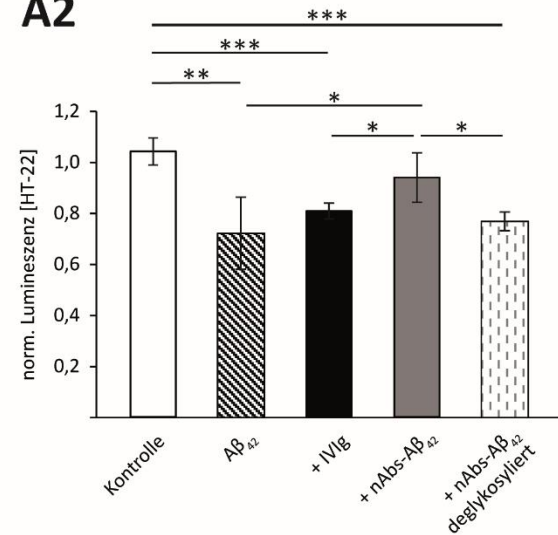
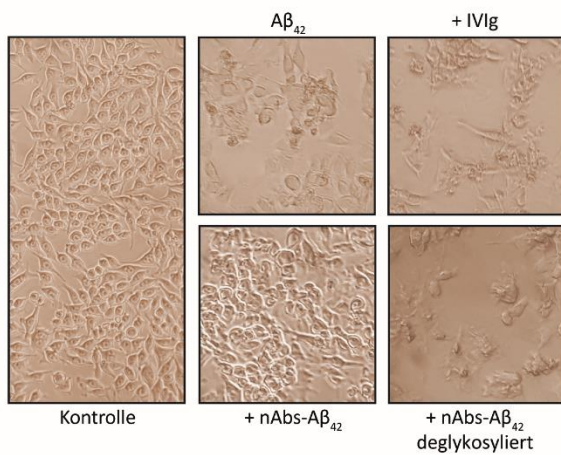
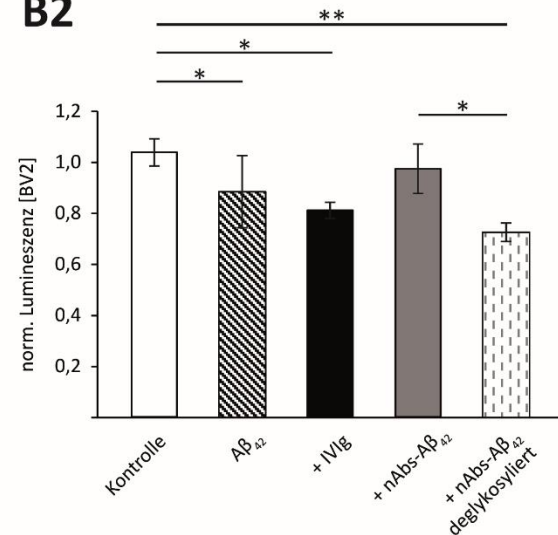
**A1****A2****B1****B2**

**Abbildung 3.14. Zellviabilität nach Behandlung mit Aβ<sub>42</sub>-Monomeren.** HT-22 (A) und BV2 (B) Zellen wurden mit Aβ<sub>42</sub>-Monomeren in An- bzw. Abwesenheit von (de)glykosylierten nAbs-Aβ<sub>42</sub> oder IVIg inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurde die Zellviabilität sowohl durchlichtmikroskopisch (1) als auch indirekt über eine ATP-abhängige Lumineszenzreaktion (2) untersucht. Dabei erfolgte die Normierung der Daten auf die Lumineszenzmessung von Zellen, welche mit purem Zellkulturmedium inkubiert wurden.

Nach der Behandlung mit Aβ<sub>42</sub>-Oligomeren konnten bei beiden Zelltypen deutlich stärkere Effekte nachgewiesen werden (Abb. 3.15.) HT-22 Zellen zeigten nach Inkubation mit dem Peptid eine signifikant reduzierte Zellviabilität ( $p = 0,006$ ), welche sowohl durchlichtmikroskopisch als auch mithilfe einer verringerten Lumineszenz auf  $0,723 \pm 0,142$  dargelegt wurde (Abb. 3.15, A1+A2). Mittels glykosylierten nAbs-Aβ<sub>42</sub> konnte der Anteil überlebender Zellen gesteigert werden.

Gegenüber der Behandlung mit Oligomeren kam es bei diesem Ansatz zu einer signifikanten Zunahme der Lumineszenz auf  $0,939 \pm 0,097$  ( $p = 0,046$ ). Die Zugabe von IVIg bzw. deglykosylierten nAbs rief eine normierte Lumineszenz von  $0,807 \pm 0,031$  bzw.  $0,769 \pm 0,036$  hervor, führte somit zu keiner Verbesserung der Viabilität nach A $\beta_{42}$ -Behandlung, sondern war in beiden Fällen sogar gegenüber der Kontrolle ( $p < 0,001$ ) sowie der Behandlung mit glykosylierten nAbs (IVIg:  $p = 0,038$ ; deglykosylierte nAbs-A $\beta_{42}$ :  $p = 0,045$ ) signifikant reduziert. Neben verringerten Zellzahlen konnten bei der Behandlung mit dem Peptid alleine sowie zusätzlich mit deglykosylierten nAbs oder IVIg morphologische Veränderungen in Form kugeliger Zellkörper identifiziert werden (Abb. 3.15, A1).

Die Behandlung von BV2 Zellen lieferte ähnliche Resultate (Abb. 3.15, B1+B2). A $\beta_{42}$ -Oligomere verursachten eine signifikante Reduktion der Zellviabilität ( $p = 0,036$ ), die wiederum durch Koinkubation mit glykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  vermindert werden konnte. Demgegenüber führte die zusätzliche Behandlung mit IVIg ( $p = 0,027$ ) oder deglykosylierten nAbs ( $p = 0,003$ ) wieder zu einer signifikanten Abnahme überlebender Zellen. Die normierte Lumineszenz lag in diesen Fällen bei  $0,886 \pm 0,083$ ,  $0,973 \pm 0,042$ ,  $0,810 \pm 0,114$  bzw.  $0,726 \pm 0,078$ . Ein weiterer signifikanter Unterschied konnte zwischen glykosylierten und deglykosylierten nAbs ausgemacht werden ( $p = 0,034$ ).

**A1****A2****B1****B2**

**Abbildung 3.15. Zellviabilität nach Behandlung mit  $A\beta_{42}$ -Oligomeren.** HT-22 (A) und BV2 (B) Zellen wurden mit  $A\beta_{42}$ -Oligomeren in An- bzw. Abwesenheit von (de)glykosylierten nAbs- $A\beta_{42}$  oder IVIg inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurde die Zellviabilität sowohl durchlichtmikroskopisch (1) als auch indirekt über eine ATP-abhängige Lumineszenzreaktion (2) untersucht. Dabei erfolgte die Normierung der Daten auf die Lumineszenzmessung von Zellen, welche mit purem Zellkulturmedium inkubiert wurden.

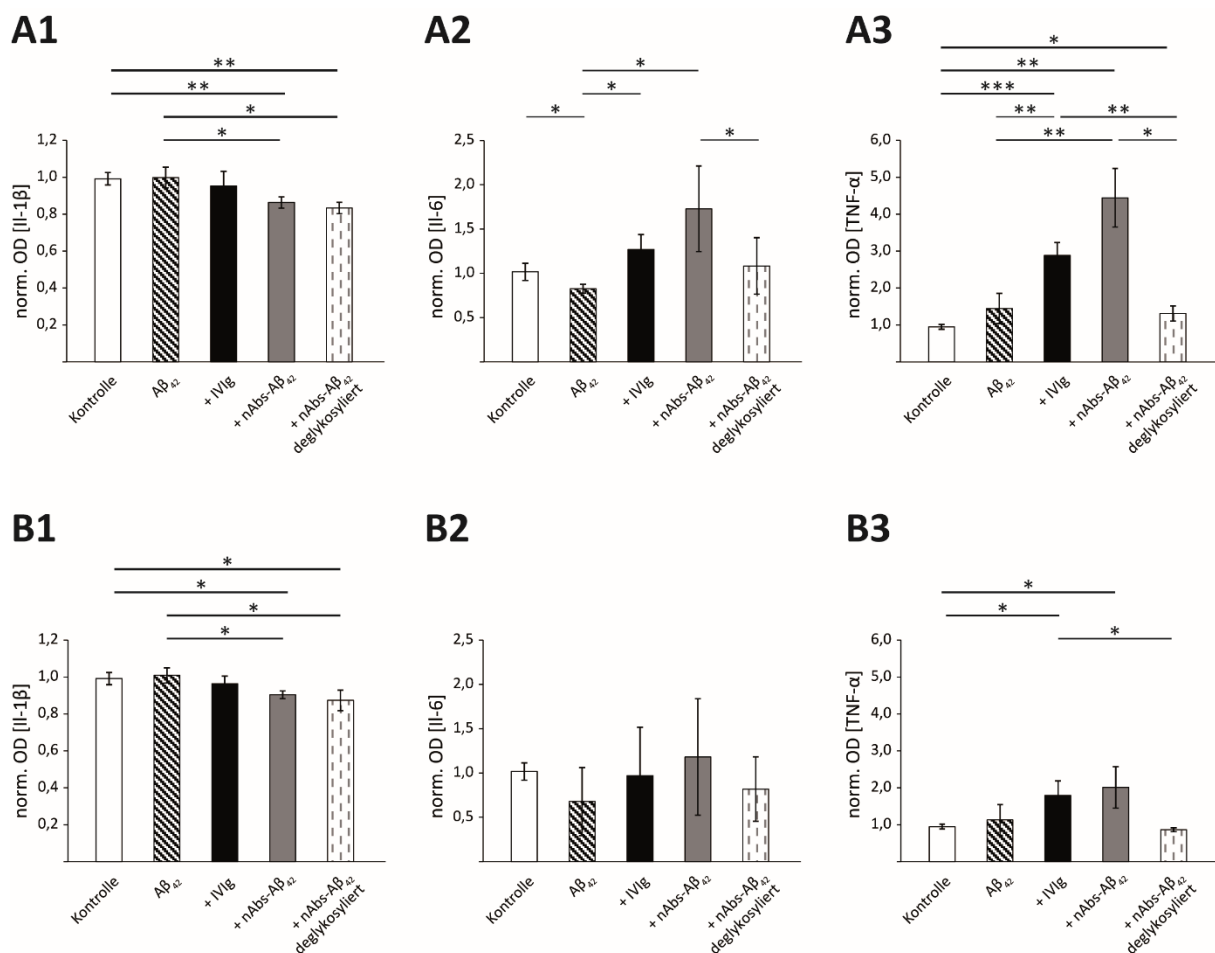
Im Zuge des Toxizitätstests erfolgte auch die Untersuchung A $\beta$ <sub>42</sub>-induzierter, inflammatorischer Prozesse. Zu diesem Zweck wurden die Zellüberstände nach der BV2 Behandlung im ELISA auf veränderte Konzentrationen der Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) als Indikatoren einer gesteigerten, Stress-vermittelten Aktivierung der Mikrogliazellen samt erhöhter Phagozytose getestet, um pro- oder antiinflammatorische Reaktionen der Zellen darlegen zu können (Abb. 3.16). Hierfür wurden die jeweils auf die Kontrollbedingung normierten ODs herangezogen.

Die Konzentration von IL-1 $\beta$  wies lediglich nach Zugabe glykosylierter und deglykosylierter nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> eine wesentliche Veränderung auf. Diese äußerte sich bei der Behandlung mit A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren (Abb. 3.16, A1) und -Oligomeren (Abb. 3.16, B1) durch eine Reduktion, welche sowohl im Vergleich zur Kontrolle (Monomere:  $p = 0,008$  bzw.  $0,004$ ; Oligomere:  $p = 0,018$  bzw.  $0,035$ ), als auch im Vergleich zur Peptidbehandlung (Monomere:  $p = 0,021$  bzw.  $0,011$ ; Oligomere:  $p = 0,016$  bzw.  $0,028$ ) signifikant war.

IL-6 zeigte hingegen lediglich für die Behandlung mit A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren signifikante Konzentrationsänderungen (Abb. 3.16, A2). Während die alleinige Stimulation mit dem Peptid zu einer Konzentrationsabnahme führte ( $p = 0,039$ ), verursachte demgegenüber die Koinkubation mit glykosylierten nAbs ( $p = 0,032$ ) oder IVIg ( $p = 0,012$ ) eine Erhöhung der IL-6 Sekretion. Im Falle der Autoantikörper hob die Deglykosylierung diesen Effekt wieder auf und verursachte eine Reduktion gegenüber den glykosylierten nAbs ( $p = 0,032$ ).

Für das dritte Zytokin, TNF- $\alpha$ , konnten wiederum sowohl bei der Behandlung mit A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren (Abb. 3.16, A3) als auch bei der Behandlung mit A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomeren (Abb. 3.16, B3) bedeutende Unterschiede zwischen den Bedingungen offenbart werden. In beiden Fällen war die höchste TNF- $\alpha$  Konzentration nach Behandlung mit A $\beta$ <sub>42</sub> und glykosylierten nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> zu detektieren, gefolgt vom Ansatz mit IVIg, dem reinen Peptid und deglykosylierten nAbs. Hierbei waren nahezu alle Unterschiede bei der Behandlung mit A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren statistisch signifikant.

Die  $p$ -Werte lagen für den Vergleich zwischen Kontrolle und den Behandlungsansätzen mit (de)glykosylierten nAbs bzw. IVIg bei 0,002, 0,044 bzw. 0,001, für den Vergleich zwischen IVIg und dem reinen Peptid bzw. deglykosylierten nAbs bei 0,010 bzw. 0,003 und für den Vergleich zwischen glykosylierten nAbs und dem reinen Peptid bzw. deglykosylierten nAbs bei 0,004 bzw. 0,028. Demgegenüber konnten nach Behandlung mit Oligomeren aufgrund geringerer Effektstärken lediglich Signifikanzen zwischen Kontrolle und IVIg ( $p = 0,021$ ) bzw. glykosylierten nAbs-A $\beta_{42}$  ( $p = 0,031$ ) sowie zwischen IVIg und deglykosylierten Autoantikörpern ( $p = 0,043$ ) nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.16. Zytokin-Sekretion nach BV2 Behandlung.** Mittels ELISA wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-1 $\beta$  (1), IL-6 (2) und TNF- $\alpha$  (3) in den Überständen von BV2 Zellen nach Behandlung mit A $\beta_{42}$ -Monomeren (A) oder -Oligomeren (B) in An- bzw. Abwesenheit von (de)glykosylierten nAbs oder IVIg bestimmt. Es erfolgte eine Normierung der OD auf die Kontrollbedingung.

### 3.4 Fc N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta_{42}$ bei der Alzheimer-Krankheit

Nachdem die funktionelle Bedeutung der N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta_{42}$  aufgezeigt und charakterisiert wurde, sollten potentielle Veränderungen im Rahmen der Alzheimer-Krankheit und damit neue ätiologische Mechanismen und diagnostische Möglichkeiten aufgedeckt werden. Hierfür wurde eine explorative Patientenstudie, welche 20 Alzheimer-Patienten und 20 Kontrollprobanden einschloss, durchgeführt. Neben einer gleichmäßigen Verteilung der Geschlechter sowie des Alters, wurden vor allem kognitive Fähigkeiten der Patienten bei der Rekrutierung berücksichtigt (Tab. 3.3). Diese wurden mithilfe des MMST beurteilt und waren das einzige Merkmal, in welchem sich die Kohorten signifikant voneinander unterschieden ( $p < 0,001$ ).

**Tabelle 3.4. Demographische Merkmale der Studienteilnehmer.** Zwanzig Kontrollprobanden (englisch: control proband, CTR) sowie 20 Patienten mit einer diagnostizierten Alzheimer-Krankheit (englisch: Alzheimer's Disease, AD) wurden für die Patientenstudie rekrutiert. Dargestellt sind die Anzahl männlicher (m) und weiblicher (w) Studienteilnehmer, ihr Alter sowie die Ergebnisse der kognitiven Testung. MW = Mittelwert, STABW = Standardabweichung, Min = Minimalwert, Max = Maximalwert, MMST = Mini-Mental-Status-Test.

	CTR	AD	p-Wert
<b>n (m/w)</b>	20 (10/10)	20 (10/10)	1,000
<b>Alter [Jahre]</b> (MW $\pm$ STABW) (Min-Max)	70,6 $\pm$ 10,4 52-90	74,8 $\pm$ 9,3 55-87	0,183
<b>MMST [Punkte]</b> (MW $\pm$ STABW) (Min-Max)	29,1 $\pm$ 1,4 26-30	20,4 $\pm$ 3,7 14-25	< 0,001

Von jedem Patienten wurden ausgehend von venösen Blutproben nAbs-A $\beta_{42}$  aus dem Serum aufgereinigt und die Glykosylierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Angesichts des geringen Anteils des Autoantikörpers im Gesamtpool von IgG, beschränkten sich die Analysen auf die N-Glykosylierung des Fc-Fragments.

Weitere Gründe für die Vernachlässigung der Fab-Glykosylierung stellten die wenig erfolgsversprechende Untersuchung sowie der problematische Vergleich zwischen Einzelspendern dar, da Fab Glykane in nur 20 % aller Fälle überhaupt vorhandenen und dann in der Regel an den variablen Domänen der polyklonalen Antikörper angefügt sind.

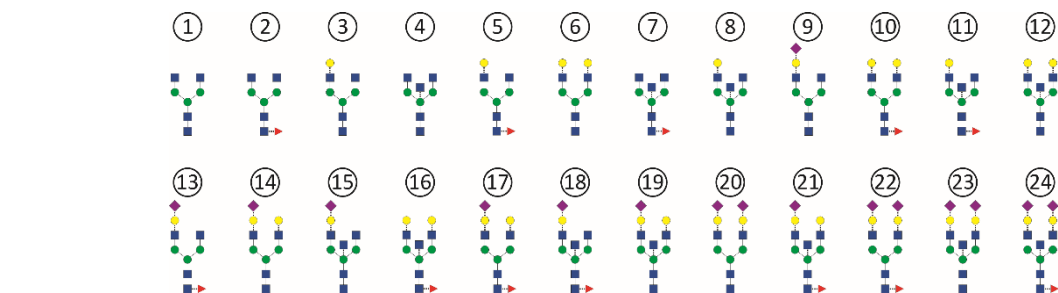
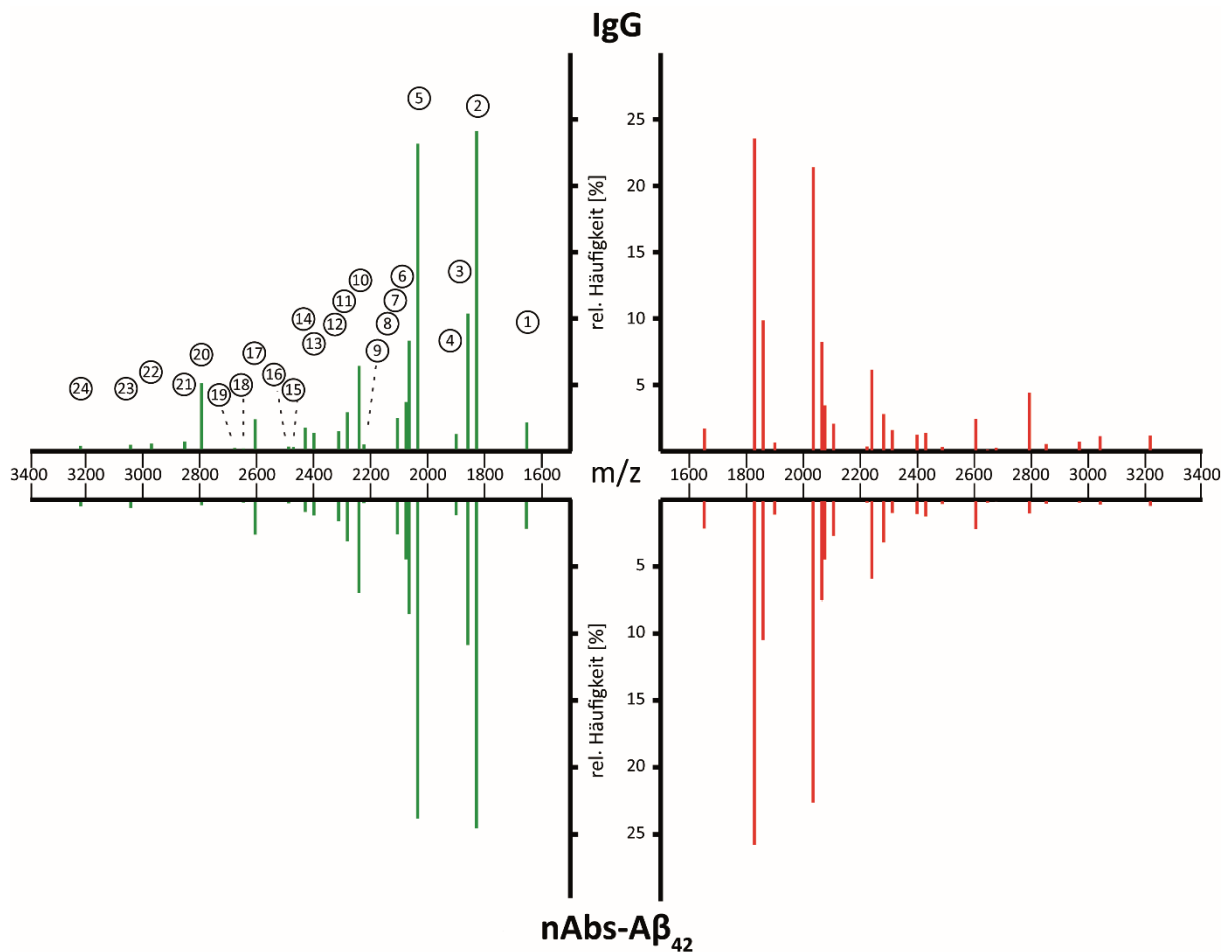
Die Fc N-Glykosylierung wurde hingegen von jedem Patienten analysiert und anschließend die relativen Häufigkeiten der einzelnen Glykane bestimmt. Nach Berechnung der Mittelwerte konnten sowohl für die Kontrollprobanden als auch für die Alzheimer-Patienten die Fc N-Glykosylierungsmuster der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> dargestellt und miteinander verglichen werden (Abb. 3.17; Tab. 3.4). Neben den Autoantikörpern wurde auch das Gesamt-IgG dahingehend ausgewertet.

Zunächst erschienen die Verteilungen der IgG- und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>-assoziierten Fc N-Glykane zwischen den Kohorten sehr ähnlich (Abb. 3.17). Erst nach genauerer Betrachtung und Überprüfung der relativen Häufigkeiten konnte festgestellt werden, dass bei Gesamt-IgG in der Kontrollgruppe Glykan Nr. 18 und bei den Alzheimer-Patienten Glykan Nr. 15 nicht nachweisbar waren (Abb. 3.17; Tab. 3.4). Darüber hinaus zeigten Alzheimer-Patienten mit einer relativen Häufigkeit von  $0,6 \pm 0,7$  gegenüber  $1,1 \pm 0,8$  eine signifikante Reduktion von Glykan Nr. 4 (Tab. 3.5).

Auch zwischen den nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> der Kontrollen und Patienten konnten solche Unterschiede aufgedeckt werden. Während Glykan Nr. 21 und 22 nur in der Alzheimergruppe detektiert wurden, konnten für Glykan Nr. 12, 20 und 22 zusätzlich bedeutende Unterschiede bestimmt werden. Ersterer zeigte dabei eine von  $1,5 \pm 0,8$  auf  $0,9 \pm 0,7$  signifikant verringerte, letztere eine von  $0,3 \pm 0,6$  auf  $0,9 \pm 1,4$  (Nr. 20) bzw. von 0 auf  $0,1 \pm 0,2$  (Nr. 22) signifikant erhöhte relative Häufigkeit (Abb. 3.17; Tab. 3.4; Tab. 3.5).

Innerhalb der Gruppen offenbarte der Vergleich zwischen der Fc N-Glykosylierungsmuster von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> größere Unterschiede (Abb. 3.17; Tab. 3.4). Während bei den Kontrollen die Glykane 15, 19, 21 und 22 für nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> nicht nachzuweisen waren, fehlte Glykan Nr. 18 in der IgG Probe (Abb. 3.17; Tab. 3.4). Außerdem zeigten sich zwischen insgesamt sechs Glykanen signifikante Unterschiede in den relativen Häufigkeiten (Tab. 3.4; Tab. 3.5). In der Patientengruppe ließen sich die Glykane 15 und 19 für nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> und Glykan Nr. 15 für IgG nicht nachweisen. Erneut konnten darüber hinaus mehrere Zuckerketten gefunden werden, welche statistisch signifikante Unterschiede in den relativen Häufigkeiten aufwiesen (Tab. 3.4; Tab. 3.5).

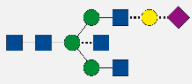
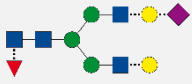
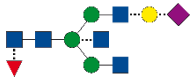
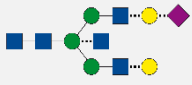
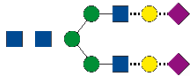
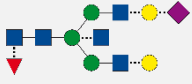
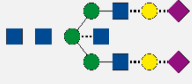
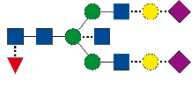




**Abbildung 3.17. Fc N-Glykosylierungsmuster von IgG und nAbs-Aβ<sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Mittlere Massenspektren der Fc-assoziierten Glykane von IgG und nAbs-Aβ<sub>42</sub> aus Kontrollprobanden (grün) sowie Alzheimer-Patienten (rot). Jeder Peak repräsentiert einen Glykan bestimmter Zusammensetzung und konnte über die spezifische Masse ( $m$ )/Ladung ( $z$ ) (X-Achse) als Messgröße der MALDI-TOF-basierten Massenspektrometrie ermittelt werden. Die Peakintensitäten wurden auf die jeweilige Gesamtintensität normiert, um die relative Häufigkeit der einzelnen Glykane (Y-Achse) darstellen zu können. Die Zusammensetzungen aller 24 möglichen Glykane sind in der Legende dargestellt: blaues Quadrat = N-Acetylglucosamin, rotes Dreieck = Fucose, grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Galaktose, violette Raute = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure.

**Tabelle 3.5. Relative Häufigkeiten der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die Nummerierung, die schematische Struktur (blaues Quadrat = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), rotes Dreieck = Fucose (Fuc), grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Galaktose (Gal), violette Raute = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)), die IUPAC Nomenklatur (F = Fuc, A = GlcNAc, B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Gal, S = Neu5Ac) sowie die relativen Häufigkeiten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der Fc-assoziierten Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aus Kontrollprobanden (CTR) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (AD).

Struktur	IUPAC	rel. Häufigkeit [%]			
		CTR		AD	
		IgG	nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>	IgG	nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>
①	A2G0	2,0 $\pm$ 1,3	2,0 $\pm$ 1,4	1,6 $\pm$ 1,5	2,1 $\pm$ 1,5
②	FA2G0	23,8 $\pm$ 6,2	24,4 $\pm$ 5,5	23,3 $\pm$ 8,0	25,7 $\pm$ 6,6
③	A2G1	10,1 $\pm$ 2,4	10,7 $\pm$ 2,7	9,7 $\pm$ 2,5	10,4 $\pm$ 2,0
④	A2BG0	1,1 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 1,1
⑤	FA2G1	22,8 $\pm$ 4,0	23,7 $\pm$ 4,3	21,1 $\pm$ 4,2	22,5 $\pm$ 4,6
⑥	A2G2	8,1 $\pm$ 1,6	8,4 $\pm$ 1,8	8,1 $\pm$ 1,7	7,4 $\pm$ 1,7
⑦	FA2BG0	3,5 $\pm$ 1,5	4,3 $\pm$ 1,0	3,3 $\pm$ 0,8	4,4 $\pm$ 1,6
⑧	A2BG1	2,3 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 1,1	2,0 $\pm$ 1,0	2,6 $\pm$ 0,6
⑨	A2G1S1	0,4 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,3
⑩	FA2G2	6,2 $\pm$ 2,1	6,8 $\pm$ 2,7	6,0 $\pm$ 3,0	5,8 $\pm$ 2,1
⑪	FA2BG1	2,8 $\pm$ 0,6	3,0 $\pm$ 0,9	2,7 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 0,6
⑫	A2BG2	1,3 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,7
⑬	FA2G1S1	1,2 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 1,1
⑭	A2G2S1	1,6 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 1,0

⑮		A2BG1S1	$0,2 \pm 0,4$	0	0	0
⑯		FA2BG2	$0,2 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,3$
⑰		FA2G2S1	$2,2 \pm 1,2$	$2,4 \pm 1,3$	$2,3 \pm 1,5$	$2,1 \pm 1,4$
⑱		FA2BG1S1	0	$0,1 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,3$
⑲		A2BG2S1	$0,1 \pm 0,3$	0	$0,2 \pm 0,6$	0
⑳		A2G2S2	$4,9 \pm 3,3$	$0,3 \pm 0,6$	$4,3 \pm 2,6$	$0,9 \pm 1,4$
㉑		FA2BG2S1	$0,6 \pm 0,5$	0	$0,5 \pm 0,8$	$0,2 \pm 0,5$
㉒		FA2G2S2	$0,4 \pm 0,5$	0	$0,6 \pm 0,8$	$0,1 \pm 0,2$
㉓		A2BG2S2	$0,3 \pm 0,6$	$0,5 \pm 1,2$	$1,0 \pm 2,0$	$0,3 \pm 0,6$
㉔		FA2BG2S2	$0,3 \pm 0,4$	$0,4 \pm 1,0$	$1,1 \pm 1,6$	$0,4 \pm 1,1$

**Tabelle 3.6. Statistischer Vergleich der Fc N-Glykosylierung von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die *p*-Werte signifikanter Unterschiede nach Anwendung statistischer Tests zur Überprüfung unterschiedlicher relativer Häufigkeiten einzelner Glykane zwischen Kontrollprobanden (**CTR**) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (**AD**). Die Oligosaccharide wurden mithilfe ihrer Nummerierung sowie der IUPAC Nomenklatur gekennzeichnet: F = Fucose, A = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Galaktose, S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure.

	<b>CTR IgG</b>				<b>AD nAbs</b>			
	<b>Glykan</b>		<b><i>p</i>-Wert</b>		<b>Glykan</b>		<b><i>p</i>-Wert</b>	
<b>CTR nAbs</b>	⑦	FA2BG0	*	0,031				
	⑭	A2G2S1	**	0,003	⑫	A2BG2	*	0,012
	⑮	A2BG1S1	*	0,046	⑳	A2G2S2	*	0,025
	⑳	A2G2S2	***	0,000	㉒	FA2G2S2	*	0,038
	㉑	FA2BG2S1	***	0,001				
	㉒	FA2G2S2	**	0,003				
<b>AD IgG</b>					⑦	FA2BG0	**	0,005
	④	A2BG0	*	0,049	⑧	A2BG1	*	0,033
					⑳	A2G2S2	***	0,000
					㉒	FA2G2S2	*	0,039

Nach Auswertung der Massenspektren wurden die IgG- und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>-assoziierten Fc N-Glykane hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur vorhandenen Zucker in Gruppen zusammengefasst und miteinander verglichen (Abb. 3.18; Tab. 3.6). Dabei wurde aufgrund potentiell veränderter funktioneller Eigenschaften zwischen Glykanen mit (F1) oder ohne (F0) Fuc, mit (B1) oder ohne (B0) b-GlcNAc, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Gal sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) Neu5Ac unterschieden. Zusätzlich wurde der Anteil von Glykanen ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0), der Anteil von Glykanen mit Fuc, mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS) sowie der Anteil der fünf häufigsten Glykane (5H) bestimmt.

Während innerhalb der Studiengruppen zwischen den Antikörpern für den Fucosylierungs-, den Galaktosylierungs- sowie den Sialylierungsstatus signifikante Unterschiede zu finden waren, zeigte die N-Acetylglucosaminierung keine Veränderungen (Abb. 3.18, A1-A4; Tab. 3.6; Tab. 3.7). Hierbei wiesen die Oligosaccharide der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> einen höheren Anteil Fucose, einen geringeren Anteil zweifach und damit einen erhöhten Anteil einfach und agalaktosylierter Glykane und einen geringeren Anteil zweifach und höheren Anteil asialylierter Glykane auf.

Die statistischen Vergleiche von IgG oder nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> zwischen Kontrollprobanden und Alzheimer-Patienten offenbarten hingegen in nur einem einzigen Fall signifikante Unterschiede. Die Autoantikörper der Patienten wiesen einen erhöhten Anteil Glykane mit zwei zusätzlichen Neu5Ac auf (Abb. 3.18, A4; Tab. 3.6; Tab. 3.7).

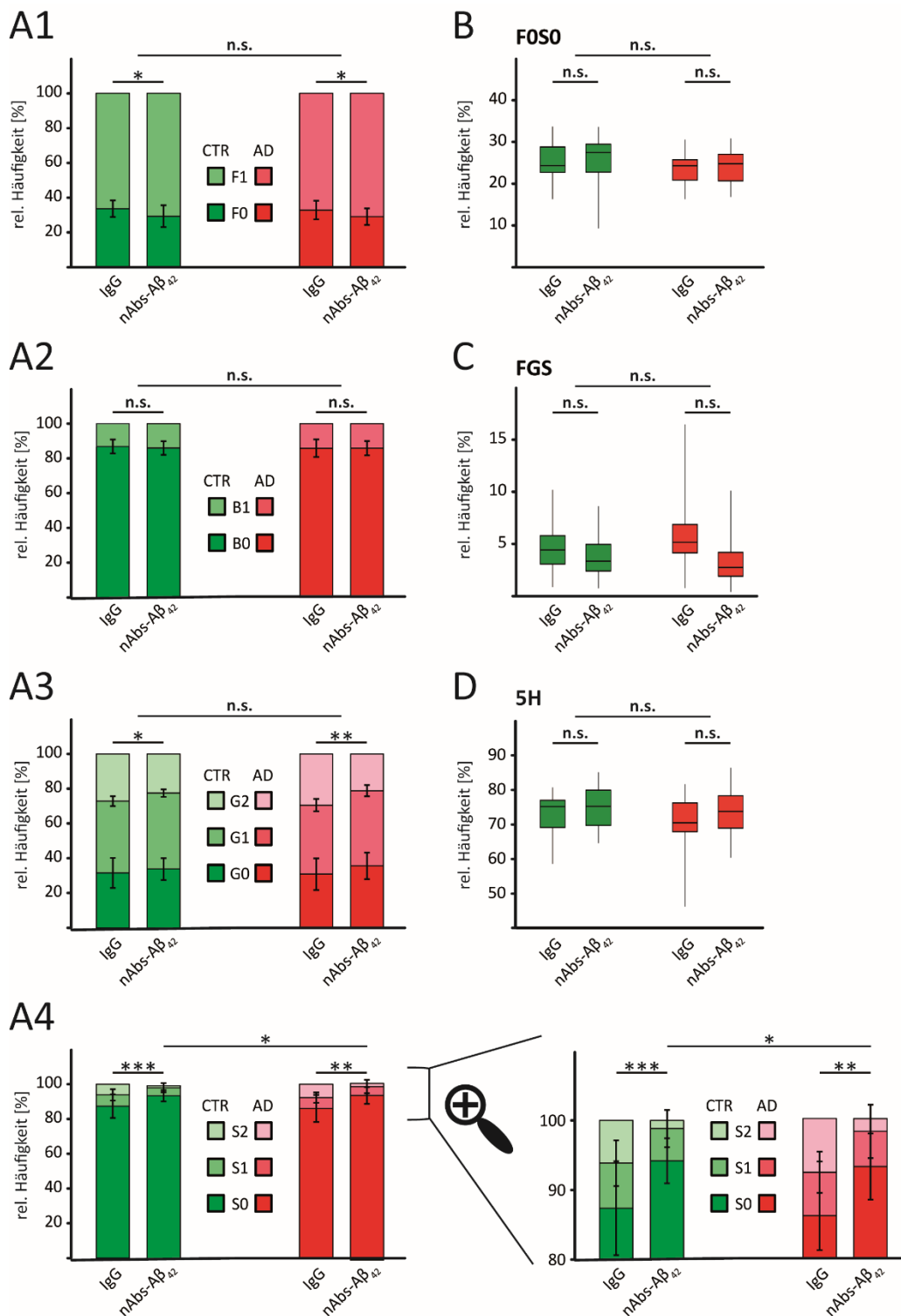
Glykane ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0), mit Fuc und mindestens einer Gal sowie Neu5Ac (FGS) bzw. der Anteil der fünf häufigsten Glykane (5H) zeigten weder signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpern noch zwischen Kontrollprobanden und Alzheimer-Patienten (Abb. 3.18, B-D; Tab. 3.6; Tab. 3.7).

Neben der dargelegten Auswertung, welche die beiden Studiengruppen jeweils in ihrer Gesamtheit berücksichtigte, wurden auch Analysen hinsichtlich des Geschlechts und Alters angestellt. Hierbei erfolgte eine Trennung der Gruppen in männliche und weibliche Versuchsteilnehmer (Abb. A1-A4; Tab. A2-A5) bzw. unter und über 75-Jährige (Abb. A5-A8; Tab. A6-A9). Obgleich sich die statistische Testung hauptsächlich auf die Gegenüberstellung von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> zwischen den alters- bzw. geschlechtsgruppierten Patienten und Kontrollen fokussierte, konnten die größten Unterschiede der Fc N-Glykosylierung innerhalb dieser Gruppen und zwischen den beiden Antikörperpools festgestellt werden (Tab. A2-A9).

Nichtsdestotrotz zeigte die geschlechtsbezogene Analyse auch signifikante Unterschiede zwischen gesunden Männern und Frauen, zwischen erkrankten Männern und Frauen sowie zwischen gesunden und erkrankten Männern oder Frauen. Solche waren jedoch bei nur ca. 3 % aller statistischen Vergleiche der Fc N-Glykosylierung auszumachen und betrafen bis auf einen Fall ausschließlich das Gesamt-IgG (Abb. A1-A4; Tab. A2-A5).

Die altersbezogene Auswertung offenbarte darüber hinaus erhebliche Unterschiede der Fc N-Glykosylierung zwischen gesunden und erkrankten unter 75-Jährigen sowie zwischen gesunden und erkrankten über 75-Jährigen.

Diese betrafen jedoch ausschließlich nAbs-A $\beta_{42}$ , welche bei der jüngeren Subkohorte der Patienten signifikant erhöhte Anteile der Glykane 14 und 20 sowie einfach sialylierter, aber einen reduzierten Anteil asialylierter Glykane zeigten. Für die älteren Alzheimer-Patienten waren gegenüber den Kontrollen bei nAbs-A $\beta_{42}$  verringerte Anteile der Glykane 6, 12, 13, 17 sowie einfach sialylierter und FGS-Oligosaccharide nachzuweisen. Auch der Vergleich zwischen den jüngeren und älteren Studienteilnehmern offenbarte signifikante Unterschiede in der Fc N-Glykosylierung, wobei nAbs-A $\beta_{42}$  häufiger als IVIg und die Patientengruppe häufiger als die Kontrollen betroffen war (Abb. A5-A8; Tab. A6-A9).



**Abbildung 3.18. Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur enthaltenen Zuckermoleküle wurden Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aus Kontrollprobanden (grün) sowie Alzheimer-Patienten (rot) zusammengefasst. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von Oligosacchariden mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc, **A1**), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc, **A2**), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal, **A3**) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, **A4**). Darüber hinaus wurde der Anteil an Glykanen ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0, **B**), mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS, **C**) bzw. der Anteil der fünf häufigsten Glykane (5H, **D**) analysiert und verglichen.

**Tabelle 3.7. Relative Häufigkeiten nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der Fc-assoziierten Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aus Kontrollprobanden (**CTR**) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (**AD**), nachdem Oligosaccharide mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zusammengefasst wurden. Darüber hinaus sind die relativen Häufigkeiten von Glykanen ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0), mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS) und der fünf häufigsten Glykane (5H) dargestellt.

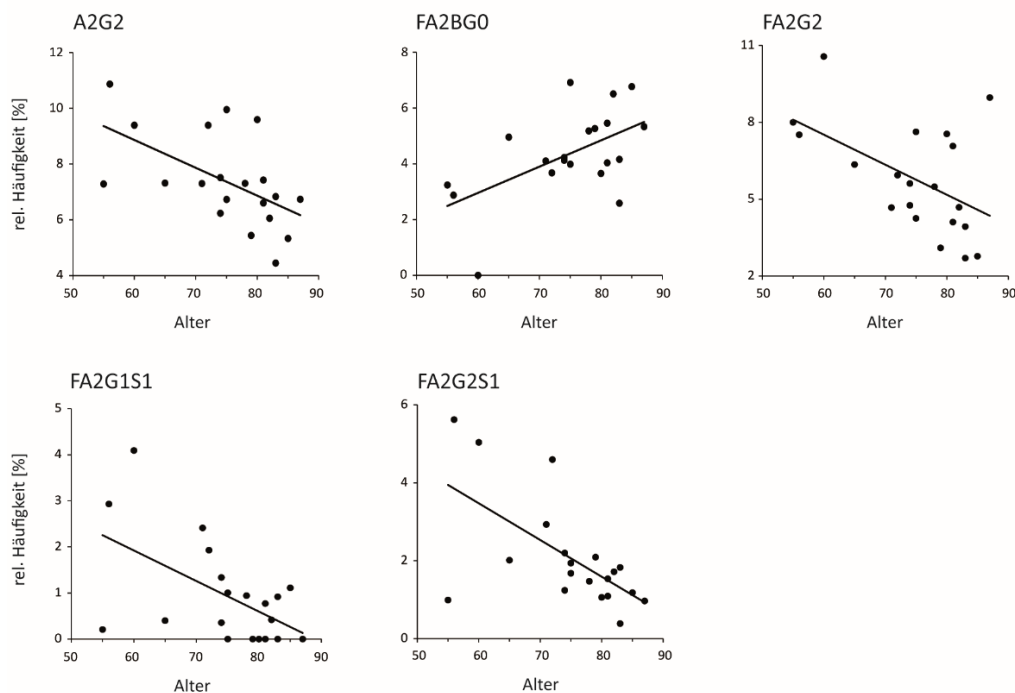
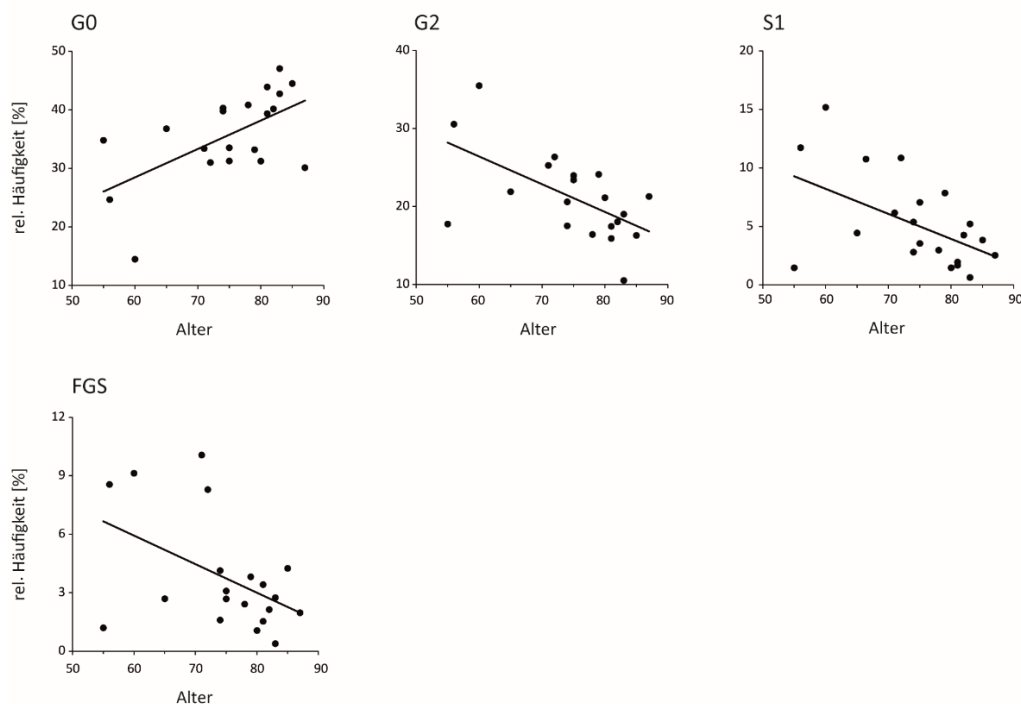
	rel. Häufigkeit [%]			
	CTR		AD	
	IgG	nAbs	IgG	nAbs
<b>F0</b>	33,6 $\pm$ 4,7	29,3 $\pm$ 6,3	32,8 $\pm$ 5,4	29,0 $\pm$ 4,7
<b>F1</b>	66,4 $\pm$ 4,7	70,7 $\pm$ 6,3	67,2 $\pm$ 5,4	71,0 $\pm$ 4,7
<b>B0</b>	86,8 $\pm$ 4,0	86,0 $\pm$ 3,9	85,8 $\pm$ 5,1	85,9 $\pm$ 4,1
<b>B1</b>	13,2 $\pm$ 4,0	14,0 $\pm$ 3,9	14,2 $\pm$ 5,1	14,1 $\pm$ 4,1
<b>G0</b>	31,6 $\pm$ 8,6	33,8 $\pm$ 6,3	30,9 $\pm$ 9,1	35,7 $\pm$ 7,6
<b>G1</b>	41,2 $\pm$ 2,9	43,7 $\pm$ 2,1	39,7 $\pm$ 3,6	43,2 $\pm$ 3,2
<b>G2</b>	27,2 $\pm$ 8,3	22,5 $\pm$ 5,2	29,4 $\pm$ 9,5	21,1 $\pm$ 5,6
<b>S0</b>	87,4 $\pm$ 6,7	94,2 $\pm$ 3,2	86,0 $\pm$ 7,8	93,1 $\pm$ 4,8
<b>S1</b>	6,5 $\pm$ 3,3	4,6 $\pm$ 2,7	6,2 $\pm$ 3,0	5,0 $\pm$ 3,8
<b>S2</b>	6,1 $\pm$ 3,9	1,2 $\pm$ 2,6	7,7 $\pm$ 6,0	1,8 $\pm$ 2,2
<b>F0S0</b>	25,1 $\pm$ 4,6	25,9 $\pm$ 5,8	23,4 $\pm$ 3,8	24,3 $\pm$ 4,1
<b>FGS</b>	4,7 $\pm$ 2,5	3,9 $\pm$ 2,0	5,7 $\pm$ 3,4	3,8 $\pm$ 2,9
<b>5H</b>	72,2 $\pm$ 5,7	74,4 $\pm$ 6,6	69,4 $\pm$ 8,4	72,4 $\pm$ 7,2



**Tabelle 3.8. Statistischer Vergleich nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die *p*-Werte signifikanter Unterschiede nach Anwendung statistischer Tests zur Überprüfung unterschiedlicher relativer Häufigkeiten der Glykane zwischen Kontrollprobanden (**CTR**) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (**AD**), nachdem Oligosaccharide mit (F1) oder ohne (F0) Fucose, mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure zusammengefasst wurden.

	<b>CTR IgG</b>			<b>AD nAbs</b>		
	Zuckerreste	<i>p</i> -Wert		Zuckerreste	<i>p</i> -Wert	
<b>CTR nAbs</b>	F0	*	0,025	S2	*	0,040
	F1	*	0,025			
	G1	***	0,001			
	G2	*	0,020			
	S0	***	0,001			
	S2	***	0,000			
<b>AD IgG</b>				F0	*	0,025
				F1	*	0,025
				G0	**	0,006
				G1	***	0,001
				G2	***	0,000
				S0	**	0,003
				S2	**	0,002

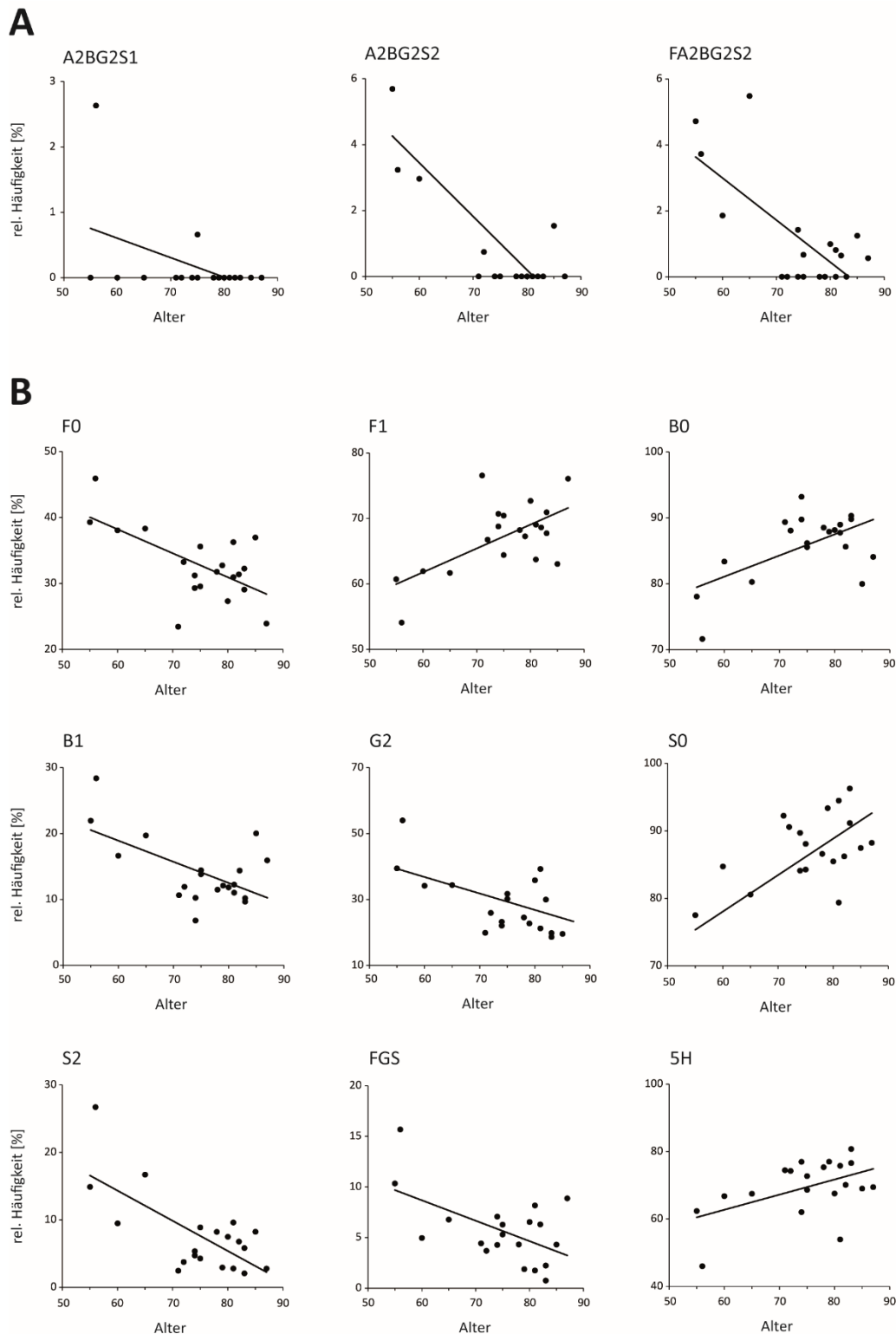
Die im Verlauf des Alterns bei Alzheimer-Patienten aufgedeckten Abweichungen der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>-assoziierten Fc N-Glykosylierung spiegeln sich auch in Korrelationsanalysen nach Pearson wider. Während bei Kontrollprobanden lediglich zwei Glykane eine Altersabhängigkeit zeigten (Abb. A9; Tab. A10), konnten für die Patientengruppe neun Korrelationszusammenhänge für die Autoantikörper bestimmt werden (Abb. 3.19, Tab. A10). Die Glykane Nr. 6 (A2G2), 10 (FA2G2), 13 (FA2G1S1) und 17 (FA2G2S1) wiesen ebenso wie der Zusammenschluss zweifach galaktosylierter (G2), einfach sialylierter (S1) und FGS-Glykane negative Korrelationen mit dem Alter auf. Demgegenüber konnten positive Zusammenhänge für Glykan Nr. 7 (FA2BG0) und zusammengefasste, agalaktosylierte Oligosaccharide identifiziert werden.

**A****B**

**Abbildung 3.19. Korrelationsanalysen der nAbs- $A\beta_{42}$ -assoziierten Fc N-Glykosylierung bei Alzheimer-Patienten.** Die relativen Häufigkeiten der einzelnen (A) sowie zusammengefassten Fc N-Glykane (B) von nAbs- $A\beta_{42}$  wurden hinsichtlich einer Altersabhängigkeit mithilfe der Pearson-Korrelation analysiert. Dargestellt sind die Korrelationsergebnisse, für die ein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden konnte. Nomenklatur zu A: F = Fucose (Fuc), A = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Galaktose (Gal), S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), Nomenklatur zu B: zusammengefasste N-Glykane mit (F1) oder ohne (F0) Fuc, mit (B1) oder ohne (B0) b-GlcNAc, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Gal sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) Neu5Ac.

Auch für Gesamt-IgG waren bei Alzheimer-Patienten Korrelationszusammenhänge mit dem Alter zu finden (Abb. 3.20, Tab. A10). Negative Korrelationen zeigten in diesen Fällen Glykan Nr. 19 (A2BG2S1), 23 (A2BG2S2), 24 (FA2BG2S2) sowie afucosylierte (F0), einfach N-acetylglucosaminierte (B1), zweifach galaktosylierte (G2), zweifach sialylierte (S2) und FGS-Glykane. Im Gegensatz hierzu waren einfach fucosylierte (F1), nicht N-acetylglucosaminierte (B0), asialylierte (S0) sowie der Anteil der fünf häufigsten Glykane positiv korreliert.

Die IgG-assoziierten Fc N-Glykane der Kontrollen zeigten hingegen keinerlei Korrelationen (Tab. A10).



**Abbildung 3.20. Korrelationsanalysen der IgG-assoziierten Fc N-Glykosylierung bei Alzheimer-Patienten.** Die relativen Häufigkeiten der einzelnen (A) sowie zusammengefassten Fc N-Glykane (B) von IgG wurden hinsichtlich einer Altersabhängigkeit mithilfe der Pearson-Korrelation analysiert. Dargestellt sind die Korrelationsergebnisse, für die ein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden konnte. Nomenklatur zu A: F = Fucose (Fuc), A = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Galaktose (Gal), S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), Nomenklatur zu B: zusammengefasste N-Glykane mit (F1) oder ohne (F0) Fuc, mit (B1) oder ohne (B0) b-GlcNAc, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Gal sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) Neu5Ac.

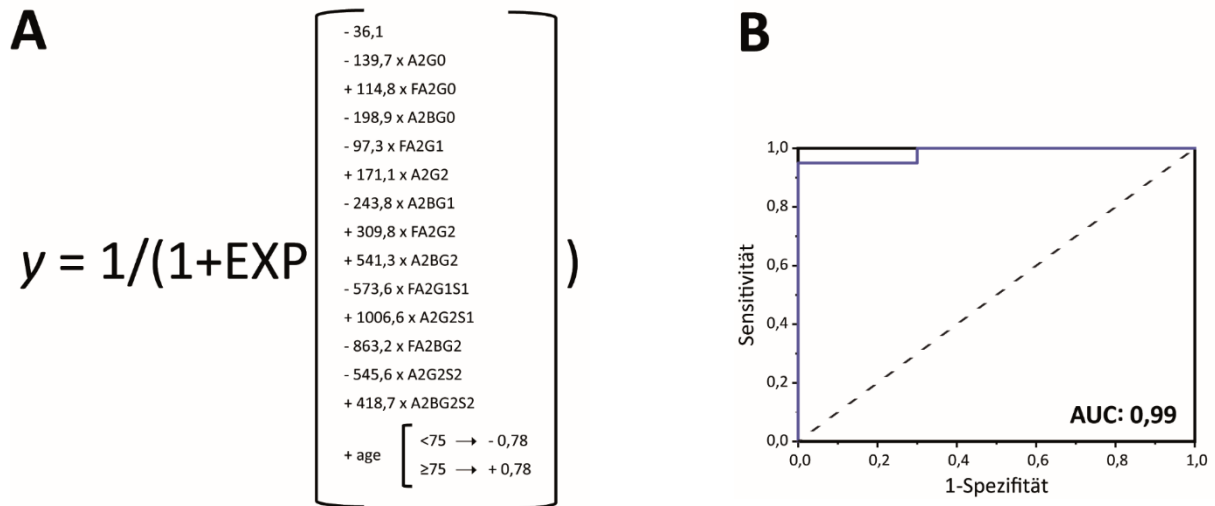
### 3.4.1 Regressionsmodell zur Identifikation von Alzheimer-Patienten

Nachdem die statistische Auswertung der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>-assoziierten Fc N-Glykosylierung auf Basis einzelner oder zusammengesetzter Glykane keine eindeutigen und robusten Kriterien zur Unterscheidung zwischen Kontrollprobanden und Alzheimer-Patienten aufzeigte, sollten Differenzierungsmöglichkeiten auf Basis eines Regressionsmodells überprüft werden.

Ein generalisiertes lineares Modell mit binomialer Verteilung und Logit-Link-Funktion wurde herangezogen, um funktionale Zusammenhänge zwischen einzelnen Fc N-Glykanen und der Kontroll- oder Patientengruppe aufzudecken und über eine Kombination mehrerer solcher ein Vorhersagemodell zur Unterscheidung der beiden Gruppen zu entwerfen. Der zugrundeliegende Algorithmus wurde hierfür mit den relativen Häufigkeiten der Glykane aller 20 Kontrollen und Patienten gespeist. Unter Einbeziehung zunächst sämtlicher Messdaten wurden für die Optimierung sukzessive jene Glykane eliminiert, welche aufgrund fehlender oder schwacher Effekte die geringste Relevanz für das Vorhersagemodell innehatten.














Im Ergebnis konnte eine Regressionsformel aufgestellt werden, die die relativen Häufigkeiten 13 verschiedener, nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>-assoziierteter Fc N-Glykane samt entsprechender Parameter sowie das Alter als Korrekturfaktor berücksichtigt (Abb. 3.21, A; Tab. 3.8). Die nach der Formel berechneten dimensionslosen Zahlen zwischen 0 und 1 werden anschließend zur Identifikation von Alzheimer-Patienten herangezogen, wobei Werte nahe 0 keine und Werte nahe 1 eine Erkrankung indizieren. Innerhalb der Formel führt die anteilige Zunahme von Glykanen mit negativem Parameter zu einer Verschiebung hin zu 1 und die von Glykanen mit positivem Faktor zu einer Verschiebung hin zu 0.

Durch Festlegen einer Grenze für den Regressionswert auf 0,54 konnten die 20 Alzheimer-Patienten mit einer Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 100 % identifiziert werden. Ein Alzheimer-Patient zeigte mit 0,256 einen vergleichbaren Regressionswert wie die Kontrollprobanden. Das Herabsetzen der Grenze verbesserte zwar die Sensitivität auf 100 %, verschlechterte jedoch die Spezifität auf 65 % (Abb. 3.21, B; Abb. A10).



**Abbildung 3.21. Regressionsmodell zur Identifikation von Alzheimer-Patienten.** (A) Mithilfe eines generalisierten linearen Modells konnte eine Regressionsformel zur Identifikation von Alzheimer-Patienten und Kontrollprobanden aufgestellt werden. Diese berücksichtigt die relativen Häufigkeiten von 13 nAbs- $\text{A}\beta_{42}$ -assoziierten Fc N-Glykanen sowie das Alter. Die Reihenfolge stellt die Relevanz der Oligosaccharide für das Vorhersagemodell dar. Die nach der Formel berechneten dimensionslosen Zahlen zwischen 0 und 1 dienen nach Festsetzen einer Grenze der Identifikation von Alzheimer-Patienten. Nomenklatur: F = Fucose, A = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Galaktose, S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure. (B) ROC-Kurve des Vorhersagemodells.

**Tabelle 3.9. Fc N-Glykane des Regressionsmodells.** Dargestellt sind die Nummerierung, die schematische Struktur (blaues Quadrat = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), rotes Dreieck = Fucose (Fuc), grüner Kreis = Mannose (Man), gelber Kreis = Galaktose (Gal), violette Raute = N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)) sowie die IUPAC Nomenklatur (F = Fuc, A = GlcNAc, B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Gal, S = Sialinsäure Neu5Ac) der Glykane, die für das Regressionsmodell berücksichtigt wurden. Zusätzlich sind die zugehörigen Parameter aus der Regressionsformel und die Relevanz des jeweiligen Glykans für das Vorhersagemodell dargestellt.

	Struktur	IUPAC	Faktor	Relevanz
①		A2G0	-139,7	12
②		FA2G0	+114,8	1
④		A2BG0	-198,9	2
⑤		FA2G1	-97,3	13
⑥		A2G2	+171,1	4
⑧		A2BG1	-243,8	3
⑩		FA2G2	+309,8	9
⑫		A2BG2	+541,3	5
⑬		FA2G1S1	-573,6	11
⑭		A2G2S1	+1006,6	10
⑯		FA2BG2	-863,2	6
⑳		A2G2S2	-545,6	7
㉓		A2BG2S2	+418,7	8

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die physiologische und diagnostische Relevanz der N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta_{42}$  bei der Alzheimer-Krankheit getestet werden. Hierzu erfolgten zum einen die Charakterisierung der N-Glykosylierung hinsichtlich ihres Musters sowie ihrer funktionellen Bedeutung im Rahmen neuropathologischer Prozesse und zum anderen die vergleichende Analyse der Fc-assoziierten N-Glykane von Alzheimer-Patienten und Kontrollprobanden.

Grundlegende Vorversuche sollten zunächst eine solide experimentelle Basis für die Bearbeitung der einzelnen Fragestellungen bestätigen. Die erfolgreiche Aufreinigung von spezifischen nAbs-A $\beta_{42}$  stellte hierfür ein wesentliches Kriterium dar und konnte anhand von ELISA-Experimenten nachgewiesen werden. Folglich war eine gegenüber IVIg bzw. Gesamt-IgG und dem Flow-Through (FT) erhöhte Bindung der nAbs an A $\beta_{42}$  festzustellen, welche auf den hohen Anteil spezifischer Antikörper zurückzuführen ist und durch die Affinitätschromatographische Aufreinigung erreicht wurde. Demgegenüber enthält der IgG-Pool nur einen Bruchteil spezifisch bindender nAbs-A $\beta_{42}$ , wohingegen solche im FT und im Idealfall einer vollständigen Aufreinigung nicht mehr enthalten sind (Qu *et al.*, 2014). In vorausgegangenen Studien konnte bei nahezu identischer Durchführung der Aufreinigung A $\beta$ -reaktiver nAbs eine ähnliche Spezifität nachgewiesen werden (Dodel *et al.*, 2011; Albus *et al.*, 2018). Nichtsdestotrotz ist an dieser Stelle darauf hinzuweisen, dass eine Verunreinigung mit unspezifischen Antikörpern bei der Affinitätschromatographie nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Gleichzeitig führt die Verwendung unterschiedlicher Affinitätssäulen zu einem unbeständigen Anteil spezifischer Autoantikörper, sodass für die experimentellen Untersuchungen sämtliche Chargen gepoolt oder einzeln getestet werden müssen, wie es in der vorliegenden Arbeit erfolgt ist.

Die enzymatische Deglykosylierung der Autoantikörper als ein weiterer, essentieller Vorversuch, konnte sowohl mittels MALDI-TOF als auch mittels ELISA verifiziert werden. Die massenspektrometrische Methode offenbarte hierfür, nach Normierung auf einen internen Glykanstandard, eine Effektivität von 83,4 %.



Ein höherer Wert wurde mutmaßlich durch die Verwendung nativ gefalteter Immunglobuline und der damit einhergehenden konformationsabhängigen Störung der PNGase-Aktivität durch Verdecken vor allem der Fc-assoziierten N-Glykane verhindert. Ähnliche Zusammenhänge hinsichtlich einer herabgesetzten enzymatischen Wirkung wurden bereits für diverse Glykoproteine beschrieben (Kita *et al.*, 2007; Szabo *et al.*, 2010). Die ELISA-Experimente mit ConA dienten hingegen der Überprüfung einer Fab- und Fc-spezifischen Deglykosylierung. Während das Lektin die Fc N-Glykane von IgG aufgrund sterischer Hinderungen erst nach Verlust der Tertiär- und Quartärstruktur binden kann, erkennt es die stärker exponierten Fab-Glykane des Antikörpers auch im gefalteten Zustand (Dalziel *et al.*, 1999; Lammerts van Bueren *et al.*, 2011). Die Denaturierung mittels DTT führte somit zu einer verstärkten Bindung von ConA aufgrund nun zugänglicher Fc N-Glykane. Darüber hinaus offenbarten die Abnahme der ConA-Bindung nach Deglykosylierung sowie deren fehlende Zunahme nach erneuter Denaturierung die erfolgreiche Abtrennung der Zucker sowohl am Fab- als auch am Fc-Fragment. Auch die Überprüfung der erfolgreichen Herstellung von A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomeren war für die Vorbereitung der experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit von entscheidender Bedeutung. Bei A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomeren handelt es sich laut Definition zumeist um sphärische und bis zu 35 nm große Strukturen, während so genannte high molecular Oligomere bzw. protofibrilläre Strukturen bis zu 200 nm Größe aufweisen können (Kayed *et al.*, 2009; Jan *et al.*, 2010; Matsumura *et al.*, 2011; Bruggink *et al.*, 2012). Vor allem erstere waren elektronenmikroskopisch nach 24 h Inkubation zu erkennen, sodass trotz diffuser Verteilung heterogener Strukturen hauptsächlich oligomeres A $\beta$ <sub>42</sub> nachzuweisen war. Für sämtliche funktionellen Experimente wurde unter anderem auf diese Formationen zurückgegriffen, da insbesondere kleinere Oligomere eine hohe und mit zunehmender Größe eine abnehmende Zytotoxizität aufweisen und somit bei den neuropathologischen Vorgängen der Alzheimer-Krankheit eine tragende Rolle spielen (Cizas *et al.*, 2010; Kaye and Lasagna-Reeves, 2013).

## 4.1 Muster und funktioneller Einfluss der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> Glykosylierung

In der Literatur finden sich diverse Studien wieder, welche sich mit der Charakterisierung der Fab- und Fc-assoziierten N-Glykosylierung von IgG auseinandersetzen (Mimura *et al.*, 2007; Bondt *et al.*, 2014; Huffman *et al.*, 2014). Im Gegensatz hierzu beinhaltet die vorliegende Arbeit als erste ihrer Art zusätzlich eine solche Analyse auf Basis spezifischer nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>.

Insgesamt 24 verschiedene Glykanstrukturen können N-verknüpft am Fc-Fragment von IgG-Molekülen assoziiert sein und weisen stets eine biantennäre, komplexe Struktur auf. Unterscheidet man zwischen der Verlängerung des  $\alpha$ -1,6- oder des  $\alpha$ -1,3-Arms, so steigt die Anzahl möglicher IgG-Glykane sogar auf über 30 an, wobei im MALDI-TOF zwischen den beiden Antennen nicht differenziert werden kann. Im Gegensatz zum Fc- können am Fab-Fragment von IgG neben biantennären auch so genannte high-Mannose-Strukturen verknüpft sein. Diese sowie multiantennäre Glykane finden sich auch bei anderen Immunglobulinklassen wieder (Arnold *et al.*, 2007).

Sowohl für IVIg als auch für nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> wurden neben der Verteilung einzelner Glykane auch die relativen Häufigkeiten der Oligosaccharide nach Zusammenschluss hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur enthaltenen Zuckerreste analysiert. Das Ziel war es hierbei, beide Glykosylierungsmuster miteinander zu vergleichen, Besonderheiten der Autoantikörper aufzudecken und die aus der Literatur für IgG bekannten funktionellen Einflüsse der Glykosylierung auf potentielle Variationen der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> zu übertragen (Reusch and Tejada, 2015; Kronimus *et al.*, 2019). Ein solcher Transfer sollte im Zuge der darauffolgenden, funktionellen Experimente gerechtfertigt werden, erscheint jedoch bereits aufgrund der Zugehörigkeit von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> zu den Immunglobulinen G als naheliegend (Gold *et al.*, 2012).

Obwohl die Massenspektren von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> nahezu identische Verteilungen der Fc N-Glykane aufwiesen, konnten einzelne Oligosaccharide im jeweils anderen Spektrum nicht, und Glykan Nr.1 bei den Autoantikörpern verstärkt detektiert werden. In all diesen Fällen handelte es sich jedoch um Oligosaccharide, welche in den MALDI-TOF-Experimenten Peakintensitäten knapp oberhalb des Signal/Rausch-Schwellenwertes vermittelten. Solche Daten werden nicht selten für den Vergleich von Massenspektren vernachlässigt, da sie aufgrund der aufwändigen Probenvorbereitung samt variablem Hintergrundrauschen durch Messschwankungen verursacht sein können (Krutchinsky and Chait, 2002; Lundstrom *et al.*, 2014).

Nichtsdestotrotz zeigten sich auch nach Zusammenfassung der Fc N-Glykane zwischen nAbs-A $\beta_{42}$  und IVIg unterschiedliche Glykosylierungsprofile. Hierbei konnte ein signifikant verringerter Galaktosylierungsstatus für die Autoantikörper festgestellt werden. Mehrere Studien legen in solchen Fällen eine erhöhte Affinität zu Rezeptoren und eine verringerte Affinität zu C1q dar, was auf einen spezifisch angepassten Wirkmechanismus der Autoantikörper hindeuten könnte (Boyd *et al.*, 1995; Nimmerjahn *et al.*, 2007; Anthony *et al.*, 2008a). Bei einem solchen ließe sich unter anderem die Aufrechterhaltung der Proteostase des in der Regel physiologischen Antigens als Hauptaufgabe von Autoantikörpern durch das verstärkte Auslösen von Prozessen wie der ADCP als Folge erhöhter Affinitäten zu Fc $\gamma$ R effizienter bewerkstelligen (Lutz, 2007; Herter *et al.*, 2014). Solche physiologischen Unterschiede der N-Glykosylierung von Antikörpern müssten dabei innerhalb des zellulären Glykosylierungsapparates begründet sein und sind aufgrund des unterschiedlichen Ursprungs von nAbs und herkömmlichen Antikörpern denkbar. Während nAbs von B1-Zellen im Zuge der angeborenen Immunität zeitlebens produziert werden, erfolgt die Synthese der herkömmlichen, nach Antigen-Stimulation produzierten und somit des Großteils der in IVIg enthaltenen Antikörper in B2-Zellen (Gold *et al.*, 2012; Holodick *et al.*, 2017). Beide Zellpopulationen unterscheiden sich unter anderem in ihrer Lokalisierung, in typischen Oberflächenproteinen, aber auch in vielen weiteren Eigenschaften, wodurch sie verschiedensten Regulationsmechanismen und Einflussfaktoren unterschiedlich stark ausgesetzt sein können (Rothstein *et al.*, 2013). Ein Hinweis liefert dabei Interleukin-21, welches auf B1- und B2-Zellen divergente Signalfunktionen ausüben und gleichzeitig den Grad der Galaktosylierung und N-Acetylglucosaminierung modulieren kann (Tortola *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Spezifische Untersuchungen hinsichtlich der N-Glykosylierung und den damit verbundenen Mechanismen liegen für B1-Zellen bislang jedoch nicht vor.

Die N-Glykosylierung der Fab-Fragmente zeigte sowohl im Vergleich zur Fc-Glykosylierung als auch zwischen IVIg und nAbs-A $\beta_{42}$  erhebliche Diskrepanzen. Diese sind vor allem dadurch zu begründen, dass Fab-Fragmente von IgG in nur ca. 20 % aller Fälle und in diesen stets an den variablen Domänen glykosyliert sind (Jefferis, 2007; Zhang *et al.*, 2016b).

Aufgrund von heterogenen Aminosäuresequenzen, speziell in den CD-Regionen, sind Anzahl und Ort der Konsensussequenzen der N-Glykosylierung zwischen verschiedenen und innerhalb polyklonaler Antikörper ungleichmäßig verteilt, wodurch bereits unterschiedliche Voraussetzungen des gesamten Glykosylierungsprozesses bestehen (Dunn-Walters *et al.*, 2000; van de Bovenkamp *et al.*, 2016). Darüber hinaus beeinflussen auch umliegende Sequenzen die enzymatische Zugänglichkeit und somit den Prozess der N-Glykosylierung, sodass insgesamt eine objektive Vergleichbarkeit der Fab-Glykosylierung nahezu unmöglich ist. (Valliere-Douglass *et al.*, 2009; Valliere-Douglass *et al.*, 2010; van de Bovenkamp *et al.*, 2016).

Die erheblichen Abweichungen zwischen der Fab- und Fc-assoziierten N-Glykosylierungsmuster konnten darüber hinaus bereits in diversen weiteren Studien aufgedeckt werden (Bondt *et al.*, 2014; Hafkenscheid *et al.*, 2017). In allen Fällen, so auch in der vorliegenden Arbeit, zeigten sich bei Fab-Glykanen stets höhere Anteile galaktosylierter und sialylierter Glykane. Dieser Unterschied ist den am Fab-Fragment stärker exponierten und am Asparagin-297 der Fc-Fragmente durch die konstanten Domänen verdeckten Glykosylierungsstellen zuzuschreiben, wodurch die Zugänglichkeit und somit die enzymatische Aktivität von Glykosyltransferasen beeinflusst wird (van de Bovenkamp *et al.*, 2016).

Aufgrund der bereits zwischen den physiologischen Antikörperpools von IVIg und nAbs-A $\beta_{42}$  bestehenden unterschiedlichen Glykosylierungsmuster, stellt sich die Frage, ob im Zuge klar definierter, Antikörper-abhängiger Pathomechanismen eine veränderte Glykosylierung eine Rolle spielt. Die dahingehende Charakterisierung pathologischer Autoantikörper als krankheitsursächliche bzw. –begleitende Faktoren diverser Autoimmunerkrankungen könnte Aufschluss über deren funktionelle Eigenschaften sowie getriggerte immunologische Prozesse geben und somit neue ätiopathologische Erkenntnisse liefern (Gold *et al.*, 2012; Jayam Trouth *et al.*, 2012; Ingegnoli *et al.*, 2013). Obwohl erhöhte Affinitäten und/oder Konzentrationen als die wesentlichen Merkmale pathologischer Autoantikörper gelten, ist auch eine veränderte Fc N-Glykosylierung, z.B. in Form eines verstärkten proinflammatorischen Musters, denkbar (Shoenfeld *et al.*, 2014). Tatsächlich konnten solche Veränderungen unter anderem Autoantikörpern gegen citrullinierte Proteine bzw. Rheumafaktoren im Zuge der rheumatoiden Arthritis nachgewiesen werden (Goulabchand *et al.*, 2014).

Solche Untersuchungen sind jedoch nicht trivial, da die Autoantikörper für anspruchsvolle analytische Studien oft zu geringe Serum- und vor allem Liquor-Konzentration aufweisen (Franciotta *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 2017). Unter anderem aus diesem Grund sind bislang nur wenige Informationen bezüglich der Fc N-Glykosylierung spezifischer Autoantikörper verfügbar.

Neben der Aufklärung des Musters wurden auch funktionelle Einflüsse der N-Glykosylierung von IVIg und nAbs-A $\beta_{42}$  überprüft. Hierzu erfolgte ein Vergleich glykosylierter und deglykosylierter Antikörper hinsichtlich ihres Wirkmechanismus bei Prozessen, welche der Alzheimer-Krankheit-assoziierten A $\beta$ -Pathologie zugrunde liegen.

Mithilfe von ELISA- und SPR-Experimenten wurde zunächst die Antigenbindung – in diesem Fall an A $\beta_{42}$  – als Grundlage sämtlicher funktioneller Mechanismen von Antikörpern analysiert. Die aufgereinigten nAbs-A $\beta_{42}$  zeigten dabei stets eine spezifische und gegenüber IVIg erheblich gesteigerte Bindung an das monomere und oligomere Antigen, welche, wie bereits angeführt, auf den geringen Autoantikörper-Anteil innerhalb der IgG und den hohen Anteil innerhalb der aufgereinigten Probe zurückzuführen ist. Vergleichbare Ergebnisse konnten bereits für Untersuchungen der Epitopspezifität mit A $\beta_{42}$  publiziert werden (Albus *et al.*, 2018). Ein unerwartetes Ergebnis zeigte sich hingegen bei Analysen von IVIg und A $\beta_{42}$ -Oligomeren in der SPR Spektroskopie. Während die Bindung erneut deutlich verringert, aber stärker als an das monomere Peptid war, konnte in diesem Fall der kleinste  $K_D$ -Wert und somit die höchste Affinität aller untersuchten Konstellationen aus Ligand und Analyt aufgedeckt werden. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass weitere Antikörper, darunter Antigen-unabhängige, konformationsspezifische Immunglobuline, den Effekt verantworten (Ofek *et al.*, 2010; Forsstrom *et al.*, 2015; Albus *et al.*, 2018; Bonito-Oliva *et al.*, 2019). Solche spielen jedoch weder bei Bindungsanalysen an A $\beta_{42}$ -Monomere eine Rolle, noch sind sie im Autoantikörperpool nach der Aufreinigung über das monomere Peptid nachweisbar.

Mittels SPR-Analysen konnten zudem für nAbs-A $\beta_{42}$  höhere Affinitäten zum monomeren als zum oligomeren Peptid identifiziert werden. Obwohl gegensätzliche Effekte für nAbs-A $\beta_{40}$  publiziert wurden, ist die erhöhte Affinität zu A $\beta_{42}$ -Monomeren durch deren Verwendung in der Affinitätschromatographie und die dadurch bedingte Isolation spezifischer Antikörper plausibel (Dodel *et al.*, 2011).

Dennoch besteht die Möglichkeit, durch eine Peptid-verursachte Übersättigung der Aufreinigungsmatrix aggregationsähnliche Bedingungen aufgrund der räumlichen Nähe der Monomere hervorzurufen und so auch Oligomer-spezifische Autoantikörper zu isolieren. Deren Existenz konnte bereits vielfach beschrieben werden (Kayed *et al.*, 2007; Britschgi *et al.*, 2009; Perchiacca *et al.*, 2012; Murakami, 2014; Wang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017).

Die Deglykosylierung von nAbs-A $\beta_{42}$  führte sowohl in ELISA- als auch in SPR-Experimenten zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Bindung an monomere und oligomere Strukturen. Fab N-Glykane haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Antigenbindung und können nach enzymatischer oder genetischer Veränderung Affinitätsab- oder -zunahmen verursachen (Co *et al.*, 1993; Tachibana *et al.*, 1997; van de Bovenkamp *et al.*, 2018). Darüber hinaus wird auch bei Fc N-Glykanen ein Einfluss auf die Antigenbindung diskutiert. Dieser beruht jedoch auf der Stabilisierung der Konformation und somit sekundären Effekten, sodass mutmaßlich das Zusammenspiel der Deglykosylierung beider Fragmente die reduzierte Affinität und damit verringerte Bindung der Antikörper hervorruft (Feige *et al.*, 2009).

Die Ergebnisse der Bindungsanalysen wirkten sich auch auf die Inhibition der A $\beta_{42}$ -Aggregation im ThT Assay aus. Dadurch, dass diese auf der Neutralisation des Peptids nach Antigenbindung beruht, war es nicht verwunderlich, dass nAbs-A $\beta_{42}$  den größten und ihr deglykosyliertes Pendant sowie IVIg deutlich kleinere Effekte erzielten. In einer vorausgegangenen Tierstudie war es ebenfalls möglich, mithilfe der Autoantikörper die A $\beta_{42}$ -Polymerisation des anfänglich monomeren Peptids einzudämmen (Mengel *et al.*, 2013). Die Bildung solcher Aggregate stellt aufgrund neuro- und zytotoxischer Eigenschaften, insbesondere der Oligomere, einen entscheidenden pathologischen Prozess der Alzheimer Krankheit dar, welchen es im Zuge therapeutischer Maßnahmen einzudämmen gilt (Salahuddin *et al.*, 2016; Sengupta *et al.*, 2016).

Die Deglykosylierung der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> konnte neben einer verringerten Antigen- auch mit einer veränderten Rezeptorbindung assoziiert werden. Ein solcher Effekt war zudem auch für IVIg zu beobachten, während die jeweils unbehandelten Antikörper nahezu identische Bindungseigenschaften an Rezeptoren aufwiesen. Diese Vergleichbarkeit ist darauf zurückzuführen, dass es sich sowohl bei den Autoantikörpern als auch bei IVIg um Immunglobuline G handelt, welche an Fc $\gamma$ R oder auch an C1q als deren typische Effektorstrukturen binden (Schroeder and Cavacini, 2010; Gold *et al.*, 2012).

Die Interaktion mit Fc $\gamma$ RI konnte im Vergleich zu anderen Effektoren für beide Antikörper durch den Einsatz deutlich geringerer Konzentrationen nachgewiesen werden. Eine natürlicherweise erhöhte Affinität zwischen den Bindepartnern als Ursache dieser Beobachtung lässt sich dadurch begründen, dass es sich bei Fc $\gamma$ RI um einen so genannten „high-affinity receptor“ handelt (Daeron, 1997). Als einziger Vertreter weist er insgesamt drei, anstatt üblicherweise zwei homologe Bindungsdomänen auf, welche aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit den konstanten Domänen von IgG (Ig like domains) interagieren und somit die erhöhte Affinität hervorrufen (Kiyoshi *et al.*, 2015). Die Deglykosylierung führte wie bei Fc $\gamma$ RIIb und Fc $\gamma$ RIIIa erneut zu einer signifikanten Abnahme der Bindung von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>. Diesem Effekt liegen vor allem konformationsabhängige Ursachen zugrunde, da die Bindung an Rezeptoren durch das Fc-Fragment vermittelt und dessen Struktur durch die am Asparagin-297 (Asn-297) verknüpften Glykane stabilisiert wird. Dadurch wird eine offene Konformation mit der exponierten Bindestelle in der lower hinge Region und CH2-Domäne gewährleistet, welche nach Entfernung der Glykane nicht mehr gegeben und mit einem Affinitätsverlust verbunden ist (Feige *et al.*, 2009; Houde *et al.*, 2010; Vidarsson *et al.*, 2014). Für die Bindung an Fc $\gamma$ RIIIa haben darüber hinaus auch direkte Glykan-Glykan-Wechselwirkungen eine wesentliche Bedeutung. Obwohl mehrere Glykosylierungsstellen mit komplexen N-Glykanen des Rezeptors bekannt sind, scheint vornehmlich Asn-162 für die Interaktion mit Fc-assoziierten Oligosacchariden von IgG verantwortlich zu sein. Dabei führt jegliche Anpassung der IgG-Glykane zu veränderten Affinitäten zum Rezeptor, die Fucosylierung beispielsweise zu einer bis zu 50-fachen Abnahme (Ferrara *et al.*, 2011; Mizushima *et al.*, 2011).

Die Bindungsanalysen an C1q, das initiale Protein zur Auslösung der klassischen Komplementkaskade, zeigten identische Effekte wie die an Fc $\gamma$ R. IVIg und nAbs-A $\beta_{42}$  wiesen eine vergleichbare und nach Deglykosylierung erheblich herabgesetzte Affinität zum Interaktionspartner auf. Zwar handelt es sich hierbei erneut um einen konformationsabhängigen Effekt nach Entfernung der Fc N-Glykane, jedoch ist in diesem Fall die Wirkung auf die CH2-Domäne als Bindestelle des Proteins entscheidend (Reusch and Tejada, 2015).

Der DC-SIGN ELISA deckte hingegen konträre Effekte in Form einer erhöhten Antikörperbindung nach Deglykosylierung auf. Dadurch, dass es sich hierbei um einen C-Typ-Lektin-Rezeptor handelt, welcher spezifisch Kohlenhydrate erkennt und bindet, war ein solcher Effekt unerwartet und steht im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Daten, welche die Fc-Glykosylierung als Voraussetzung für eine DC-SIGN Bindung nahelegen (Kaneko *et al.*, 2006; Anthony *et al.*, 2008b). Demgegenüber steht jedoch eine Studie, die unveränderte Interaktionen mit DC-SIGN nach Änderung der IgG Glykosylierung beschreibt, darunter das vollständige Entfernen der Oligosaccharide (Yu *et al.*, 2013). Diese widersprüchlichen Ergebnisse bestätigen die bislang kontrovers geführte Debatte, ob und unter welchen Voraussetzungen es sich bei DC-SIGN tatsächlich um einen weiteren physiologischen Bindepartner von IgG handelt (Bayry *et al.*, 2009). Dass für eine nachweisbare Bindung im ELISA mit bis zu 40  $\mu$ g/ml erheblich höhere Antikörperkonzentrationen eingesetzt werden mussten als üblich, spricht dabei zunächst gegen eine spezifische Interaktion. Eine solche soll jedoch im Falle des DC-SIGN Rezeptors vornehmlich durch Immunglobuline mit  $\alpha$ -2,6-sialylierten Fc N-Glykanen vermittelt werden, welche wiederum aufgrund ihres geringen Anteils am Gesamt-IgG eine Verwendung höherer Antikörperkonzentration für eine nachweisbare Bindung begründen (Anthony *et al.*, 2008b; Anthony *et al.*, 2012; Vidarsson *et al.*, 2014). Bisweilen ist mehrheitlich die Hypothese akzeptiert, dass DC-SIGN einen spezifischen IgG-Rezeptor darstellt, welcher über Interleukin-33- und Interleukin-4-vermittelte Signalwege die verstärkte Expression von inhibitorischen Fc $\gamma$ RIIb und damit antiinflammatorische Prozesse triggert (Anthony *et al.*, 2012).



Zusätzlich zu den Bindungsanalysen wurden IVIg und nAbs-A $\beta_{42}$  hinsichtlich ihrer IgG-Subtypen analysiert, da IgG1 bis IgG4 aufgrund divergenter Eigenschaften die verschiedenen Effektorstrukturen mit unterschiedlichen Affinitäten erkennen (Vidarsson *et al.*, 2014). Während IVIg einen gegenüber den Autoantikörpern verringerten Anteil IgG1 aufwies, war der IgG2-Anteil erhöht. Solche Unterschiede waren vorab aufgrund der Verwendung von IVIg als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung der nAbs nicht zu erwarten. Nichtsdestotrotz lässt sich mit dieser Beobachtung der Effekt erklären, dass die Bindung der nAbs-A $\beta_{42}$  an Fc $\gamma$ RIIb gegenüber IVIg gesteigert war, da IgG1 an den Rezeptor eine hohe, IgG2 hingegen eine bis zu 6-fach niedrigere Affinität aufweist (Boesch *et al.*, 2017).

Die reduzierte Antigen- und Rezeptorbindung von nAbs-A $\beta_{42}$  nach Deglykosylierung führte zwangsläufig zu der Hypothese, dass Prozesse wie die Phagozytose als direkte Folge solcher Wechselwirkungen ebenfalls beeinträchtigt sind (Rosales and Uribe-Querol, 2017). Um dies zu verifizieren, wurde die mikrogliale Aufnahme von A $\beta_{42}$ -Monomeren und -Oligomeren mithilfe von BV2 Zellen nach Zugabe verschiedener Antikörperproben getestet. Für nAbs-A $\beta_{42}$  konnten signifikant erhöhte Phagozytoseraten nachgewiesen werden, während IVIg und deglykosylierte Autoantikörper keinen Effekt zeigten. Es ist hinlänglich bekannt, dass sowohl nAbs-A $\beta$  als auch andere spezifische A $\beta$ -Antikörper die mikrogliale Aufnahme und damit die Beseitigung des potentiell toxischen Agens induzieren können (Morgan, 2009; Gold *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2014). Die Bindung des Antigens stellt dabei den ersten Schritt dieser immunologischen Kaskade und gleichzeitig die Voraussetzung der mikroglialen Aktivierung als zweiten Schritt dar. Die nun gebildeten Immunkomplexe binden über das Fc-Fragment des Immunglobulins die Fc $\gamma$ R-, oder nach Aktivierung des Komplementsystems C3b-Rezeptoren, und triggern die Phagozytose des Antigens (Rosales and Uribe-Querol, 2017). Wie bereits konstatiert, verlieren die Autoantikörper nach Deglykosylierung ihre Affinität zu ihren Zielstrukturen, sodass die dargelegten Prozesse und letztendlich die Phagozytose nicht mehr ausgeführt werden kann. Eine ähnliche Wirkung, jedoch mit primären Mikrogliazellen sowie monoklonalen Antikörpern, konnten Takata und Kollegen aufdecken (Takata *et al.*, 2007). In dieser Studie wurde jedoch auch eine unveränderte Antigenbindung beschrieben – aufgrund potentiell nicht vorhandener Fab-Glykane – sodass der Effekt rein auf den Verlust der Fc-assoziierten N-Glykane zurückzuführen war.

Die auch für IVIg unveränderte mikrogliale Aufnahme wurde erneut dem geringen Anteil spezifischer A $\beta$ <sub>42</sub>-Antikörper in der Probe zugesprochen, wodurch bereits die Bildung von Immunkomplexen nahezu inexistent ist.

Generell ist der Prozess des Rezeptor-Clusterings nach Bildung multivalenter Immunkomplexe ein essentieller Mechanismus für die Auslösung der Phagozytose und kann sowohl bei Monomeren als auch bei Oligomeren gleichermaßen stattfinden. Die polyklonalen nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> sind dabei in der Lage, trotz bevorzugter Bindung am C-Terminus, verschiedene Epitope zu erkennen, das Peptid so zu opsonieren und dadurch die Voraussetzung des Clusterings zu erfüllen (Dodel *et al.*, 2011; Freeman and Grinstein, 2014). Dieser Effekt unterliegt zwangsläufig beiden Peptidformen und wird bei A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomeren zusätzlich durch die strukturelle Verknüpfung mehrerer Moleküle verstärkt.

Die Analysen der Phagozytoserate beschränkten sich stets auf den Vergleich der unterschiedlichen Antikörperproben innerhalb der A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomere und -Oligomere, da unterschiedliche Voraussetzungen eine Gegenüberstellung beider Peptidformen nur bedingt zuließen. Nachvollziehbarerweise wird das FITC-Signal durch die mikrogliale Aufnahme eines oligomeren A $\beta$ <sub>42</sub>-Moleküls stärker beeinflusst als durch die Aufnahme eines monomeren A $\beta$ <sub>42</sub>-Moleküls. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ist die Menge aufgenommenen Peptids bei der aggregierten Form zwar deutlich höher, jedoch möglicherweise durch die Molekülgröße, anstatt der tatsächlichen Phagozytoserate begründet. Die gemessenen FITC-Signale von BV2 Zellen, die ausschließlich mit den Peptidformen ohne die Zugabe von Antikörpern behandelt wurden, untermauern diese Hypothese. A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere verursachten dabei bereits ein Vielfaches der A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomer-induzierten FITC-Intensität, ein Effekt, welcher in beiden Fällen vermutlich durch spontane Pinozytose – z.B. über P2Y-Rezeptoren – der unterschiedlich großen Peptidformen hervorgerufen wurde (Li *et al.*, 2013).

Unabhängig von den bis hierher aufgezeigten, vielversprechenden funktionellen Einflüssen der nAbs auf die A $\beta$ <sub>42</sub>-Pathologie, bleibt deren wichtigste Aufgabe im Zuge einer potentiell physiologischen Relevanz bei der Alzheimer-Krankheit die Protektion cerebraler Zellen. Die Bindung des Peptids alleine ist dabei nicht ausreichend, da ein neutralisierender und damit inhibitorischer Effekt auf die Toxizität von A $\beta$ <sub>42</sub> nachgewiesen werden muss (Yasmeen *et al.*, 2014). Hierzu erfolgte die Überprüfung der Neutralisation von A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren und -Oligomeren in Zellviabilitätsassays mit neuronalen HT-22 und mikroglialen BV2 Zellen.

Für beide Zelltypen konnte zunächst festgestellt werden, dass A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere die Degeneration in erheblichem Maße, Monomere hingegen nur geringfügig verursachten. Der aktuelle Stand der Forschung geht mit dieser Beobachtung konform, denn weder den Monomeren, noch den unlöslichen Fibrillen, sondern den kleineren, löslichen A $\beta$ <sub>42</sub>-Aggregaten – ausgehend von Dimeren – konnten vielfältige, toxische Wirkungen attestiert werden. Dabei zeigt sich eine mit der Größe abnehmende Toxizität, die in den fibrillären Strukturen der Amyloid Plaques ein Minimum findet (Hardy and Selkoe, 2002; Zhao *et al.*, 2012; Kaye and Lasagna-Reeves, 2013; Sengupta *et al.*, 2016). Die schädliche Wirkung der A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere umfasst unter anderem die Störung der Calcium-Homöostase durch Bildung von Membrankanälen oder Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, die Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität sowie das Auslösen intrazellulärer Stressreaktionen in Mitochondrien und im ER. All diese Prozesse können schlussendlich als Trigger apoptotischer Signale zum Untergang von Zellen führen (Nakagawa *et al.*, 2000; Texido *et al.*, 2011; Bode *et al.*, 2017; Gulisano *et al.*, 2018).

Durch Koinkubation der Peptide mit nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> konnte die Viabilität von HT-22 sowie BV2 Zellen in der Regel gesteigert werden, was durch eine Bindung samt effektiver Neutralisation von A $\beta$ <sub>42</sub>-Monomeren und -Oligomeren zu erklären ist. Ähnliche Effekte konnten bereits für die humane Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y und nAbs-A $\beta$ <sub>40</sub> sowie in weiteren experimentellen Ansätzen mit A $\beta$  aufgezeigt werden (Dodel *et al.*, 2011; Piechotta *et al.*, 2017). Demgegenüber waren primäre, murine Mikrogliazellen durch die additional Zugabe von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> nach Behandlung mit dem oligomeren Peptid nicht zu retten (Gold *et al.*, 2013). Hierbei unterschied sich der experimentelle Ansatz jedoch nicht nur in der Verwendung des Zelltyps, sondern auch in der Herstellung der A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere, der eingesetzten Konzentrationen von Antikörper und Antigen sowie der Entwicklung des Assays.

Der fehlende protektive Effekt deglykosylierter nAbs-A $\beta_{42}$  sowie von IVIg war aufgrund der merklich herabgesetzten Bindung an A $\beta_{42}$  zu erwarten. Lediglich im Falle der mit A $\beta_{42}$ -Oligomeren behandelten HT-22 Zellen konnten für beide Antikörper minimale Verbesserungen der Zellviabilität festgestellt werden, wobei eher sterische Hinderungen als spezifische Effekte hierfür die Ursache darstellen sollten. Interessanterweise kam es bei BV2 Zellen nach Koinkubation von A $\beta_{42}$  und deglykosylierten nAbs für beide Peptidformen sogar zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. Diese Beobachtung könnte mit den Resultaten der Bindungsanalysen und hier speziell des DC-SIGN Rezeptors in Verbindung stehen. Normalerweise auf dendritischen Zellen vorkommend, kann dieser auch in regulatorischen Makrophagen oder Mikrogliazellen exprimiert sein und wird, wie bereits dargelegt, von deglykosylierten nAbs verstärkt gebunden (Durafour et al., 2012; Juknat et al., 2019). Ihre nahezu fehlende Antigenbindung verhindert jedoch gleichzeitig das Clustern von DC-SIGN, sodass die Signaltransduktion und damit antiinflammatorische Prozesse durch eine antagonistische Wirkungsweise unterbunden werden (den Dunnen et al., 2009).

Generell war festzustellen, dass die mikroglialen BV2 Zellen gegenüber den neuronalen HT-22 Zellen weniger empfindlich auf die A $\beta_{42}$ -Belastung reagierten. Beide Zelltypen sind ihrem biochemischen Milieu gleichermaßen ausgesetzt und in der Lage, über Makropinozytose die umliegende Flüssigkeit samt A $\beta_{42}$  und anderer darin gelöster Stoffe aufzunehmen. Aufgrund der neuronal jedoch weniger stark ausgeprägten Degradationssysteme besteht die Möglichkeit, dass HT-22 Zellen die toxischen Eigenschaften des nun intrazellulären Peptids schlechter kompensieren, was sich in einer sensibleren Reaktion auf die Exposition mit A $\beta_{42}$  und somit einer verringerten Zellviabilität äußern würde (Zeineddine and Yerbury, 2015).

Der Antikörper-vermittelten Modulation inflammatorischer Prozesse nach A $\beta_{42}$ -Behandlung wurde ebenso eine hohe Bedeutung beigemessen und wurde über eine ELISA-gestützte Konzentrationsbestimmung verschiedener Mediatoren im Zellüberstand der BV2 Mikroglia analysiert. Während für das Zytokin IL-1 $\beta$  bei der Koinkubation von nAbs und A $\beta_{42}$ -Monomeren oder -Oligomeren eine verringerte Sekretion festzustellen war, zeigten IL-6 und TNF- $\alpha$  einen deutlichen Konzentrationsanstieg. Nahezu identische Resultate konnten auch bei *in-vivo* Versuchen und primären Mikrogliazellen beschrieben werden (Gold et al., 2013; Mengel et al., 2013).

Lediglich die reduzierten IL-1 $\beta$  Konzentrationen waren widersprüchlich, könnten jedoch durch die Verwendung der immortalisierten Zellkultur verursacht worden sein. Bekanntermaßen ist die Sekretion von IL-1 $\beta$  maßgeblich von der Aktivität des Inflammasoms abhängig, welches bei Mikrogliazellen eine generell veränderte Aktivität aufweist (Burm *et al.*, 2015). Durch die Immortalisierung könnte dieser Multiproteinkomplex eine stärkere Beeinflussung erfahren, wodurch BV2 Zellen ein eher artifizielles Bild inflammatorischer Vorgänge zeichnen würden.

Obwohl die meisten Zytokine pleiotrope Effekte aufweisen und je nach Zelltyp unterschiedliche Kaskaden triggern können, handelt es sich bei IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  um in der Regel proinflammatorische Mediatoren, welche vor allem bei dauerhaftem Konzentrationsanstieg chronische Entzündungsreaktionen samt eines zytotoxischen Milieus erzeugen können (Schuerwegh *et al.*, 2003; Umare *et al.*, 2014). Dabei kommt vor allem TNF- $\alpha$  als eines der frühesten Zytokine inflammatorischer Prozesse eine besondere Bedeutung zu. Als sekretiertes Signalprotein ist es vor allem im Zuge der Phagozytose unerlässlich und induziert darüber hinaus die Expression und Ausschüttung von IL-6 (Riccioli *et al.*, 1995; Neniskyte *et al.*, 2014). Der Anstieg beider Zytokine nach Zugabe der nAbs-A $\beta_{42}$  war somit die Folge einer verstärkten Aktivierung der Immunzellen, welche vor allem durch die Phagozytose der A $\beta_{42}$ -Monomere und -Oligomere hervorgerufen wurde. In Bezug auf neuropathologische Vorgänge ist es zudem ein interessanter Fakt, dass ein kurzzeitiger Anstieg proinflammatorischer Prozesse nicht zwangsläufig mit degenerativen Vorgängen einhergehen muss und zum Teil sogar protektive Eigenschaften haben kann (Sriram and O'Callaghan, 2007; Wee Yong, 2010).

Im Gegensatz zu nAbs-A $\beta_{42}$  führte die Zugabe von IVIg oder deglykosylierten nAbs zu deutlich geringeren Konzentrationsänderungen der Zytokine, welche erneut auf die reduzierte Bildung von Immunkomplexen und der damit verbundenen, schwächeren Aktivierung der BV2 Zellen zurückzuführen war.

Auch zwischen den Behandlungsansätzen mit A $\beta_{42}$ -Monomeren und -Oligomeren konnten Unterschiede hinsichtlich der Menge sekretierter Zytokine offenbart werden. Erstere induzierten eine stärkere Ausschüttung der Mediatoren, was dem bereits bei der Phagozytose erläuterten Effekt der Molekülgröße zuzuschreiben ist.

Dabei führt die Phagozytose vieler, kleiner Strukturen im Vergleich zu der von wenigen, großen Strukturen zu einer vermehrten Aktivierung von Immunzellen aufgrund mehrfacher Rezeptorbindungen (vor allem Fc $\gamma$ R) und schlussendlich zur erhöhten Sekretion von in diesem Fall proinflammatorischen Zytokinen (Vogelpoel *et al.*, 2015).

## 4.2 Fc N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta_{42}$ bei der Alzheimer-Krankheit

Im zweiten Hauptteil der Dissertation stand die Untersuchung der Fc N-Glykosylierung der nAbs-A $\beta_{42}$  bei Alzheimer-Patienten und Kontrollprobanden im Fokus. Unter der Hypothese, dass die Autoantikörper einen protektiven Einfluss auf die zugrundeliegende Pathologie der Alzheimer-Krankheit ausüben und im Verlaufe dieser qualitative Veränderungen erfahren, war es ein Ziel der Arbeit, auf deren Basis neue diagnostische Optionen aufzudecken. Insbesondere die im ersten Teil der Arbeit angedeutete, physiologische Bedeutung der nAbs in Form einer Regulation der A $\beta_{42}$ -Pathologie, aber auch der direkte Zusammenhang zwischen pathologisch veränderten Fc N-Glykanen und diversen Erkrankungen, rechtfertigt diesen Ansatz und macht die nAbs-A $\beta_{42}$  Glykosylierung zu einem geeigneten Biomarker-Kandidaten (Holland *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2016a; Mittermayr *et al.*, 2017). Bislang beruht die klinische Alzheimer-Diagnostik auf einer Kombination mehrerer Parameter und Kriterien, wobei der Befund erst *post mortem* zweifelsfrei gestellt werden kann (Thal and Braak, 2005). Das Fehlen früher, verlässlicher und univariater Biomarker stellt somit ein für den klinischen Alltag entscheidendes Defizit und gleichzeitig den Anlass dar, im Zuge der vorliegenden Arbeit die mögliche Verwendung der Fc N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta_{42}$  als Grundlage für einen solchen zu prüfen (Sharma and Singh, 2016; Lashley *et al.*, 2018).

Das Glykosylierungsmuster der nAbs-A $\beta_{42}$  zeigte bei Alzheimer-Patienten hinsichtlich der relativen Häufigkeiten einzelner sowie in Gruppen zusammengeschlossener Glykane leichte Veränderungen gegenüber dem von gesunden Kontrollen. Dabei waren jedoch nur solche Strukturen betroffen, welche von Grund auf einen geringen Anteil der Glykosylierung ausmachten.

Mögliche Ursachen sowie die Problematik der Interpretation solcher Veränderungen wurden bereits im ersten Versuchsteil im Zuge der Untersuchung der Glykosylierung von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> ausführlich erläutert und führen an dieser Stelle zu der Erkenntnis, dass solche sensiblen Veränderungen seltener Glykane für die Identifikation von Alzheimer-Patienten eher ungeeignet sind. Da eine solche Analyse auf Basis natürlicher Autoantikörper in der vorliegenden Arbeit erstmalig durchgeführt wurde, lassen sich auch keine vergleichbaren Daten aus Referenzstudien mit nur ansatzweise ähnlicher Versuchsdurchführung heranziehen.

Auch die Gegenüberstellung der IgG-assoziierten Fc N-Glykane offenbarte zwischen Patienten und Kontrollen nur marginale Differenzen. In einer vorausgegangenen Studie konnte hingegen ein eindeutig reduzierter Galaktosylierungsstatus bei Alzheimer-Patienten aufgedeckt werden, wobei dieser nur für IgG1 nach einer differenzierten Analyse der IgG-Subtypen nachzuweisen war (Lundstrom *et al.*, 2014). Solche Erkenntnisse alleine sind jedoch für die Entwicklung diagnostischer Marker nicht zielführend, da über Veränderungen des Gesamt-IgG maximal allgemeingültige und keine die Alzheimer-Krankheit spezifisch betreffenden, immunologischen Effekte aufgezeigt werden. Vor allem Autoimmunerkrankungen, darunter sowohl nicht-neurologische als auch neurologische, sind typischerweise mit veränderten IgG-Glykanen assoziiert (Parekh *et al.*, 1985; Selman *et al.*, 2011; Sjowall *et al.*, 2015; Wuhrer *et al.*, 2015; Decker *et al.*, 2016).

Im Gegensatz zu den statistischen Vergleichen zwischen den Kohorten, offenbarte die Auswertung der Fc N-Glykosylierung zwischen Gesamt-IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> deutlichere Unterschiede. Diese waren jedoch gleichermaßen innerhalb der Patienten- als auch innerhalb der Kontrollgruppe nachzuweisen, weshalb ein rein krankheitsassoziierter Effekt bei nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> ausgeschlossen werden konnte.

Die Berücksichtigung sämtlicher Studienteilnehmer, ohne die Bildung von Subkohorten, konnte somit keine vielversprechenden Optionen für die diagnostische Verwendung der Fc N-Glykosylierungsmuster von IgG oder nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aufdecken. Da für die Alzheimer-Krankheit jedoch auch eine geschlechtsabhängige Prävalenz besteht und das Alter als Hauptrisikofaktor gilt, wurden zusätzliche Analysen dahingehend angestellt (Vina and Lloret, 2010; Guerreiro and Bras, 2015; Podcasy and Epperson, 2016).

Darüber hinaus konnten vom Geschlecht und Alter abhängige Veränderungen der Fc N-Glykosylierung bereits vielfach beschrieben werden, sodass für die Vermeidung überlagerter bzw. verdeckter Effekte die Bildung solcher Subkohorten zusätzlich begründet ist (Yamada *et al.*, 1997; Abes and Teillaud, 2010; Bakovic *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2016). Im Gegensatz zur geschlechts-, offenbarte die altersspezifische Auswertung (unter und über 75-jährige Studienteilnehmer) in deutlich mehr Fällen signifikante Unterschiede der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> Glykosylierung, welche sich darüber hinaus nicht mehr nur auf seltene Glykane beschränkten. Vor allem innerhalb der älteren Subpopulation waren Änderungen der relativen Häufigkeiten auszumachen, welche größtenteils mit vermeintlich proinflammatorischen Effekten einhergehen (Tab. 4.1). Dabei nahm der Sialylierungsstatus der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> in der Patientengruppe ab, eine Veränderung, welche bei IgG gemäß der aktuellen Literatur mit reduzierten antiinflammatorischen Reaktionen in Verbindung steht (Kaneko *et al.*, 2006; Anthony *et al.*, 2008b). Auch die zusammengefassten Glykane mit Fucose und mindestens einer Galaktose sowie N-Acetylneuraminsäure (FGS) zeigten eine signifikante Abnahme bei Alzheimer-Patienten und sind ein weiteres Indiz für ein reduziertes antiinflammatorisches Potential der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>, da die Anwesenheit dieser Zuckerreste vor allem die Fc $\gamma$ R-Bindung reduziert und somit proinflammatorischen Prozesse entgegenwirkt (Shields *et al.*, 2002; Kaneko *et al.*, 2006; Nimmerjahn *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2012). Solche Unterschiede waren für den IgG-Pool nicht nachzuweisen, sodass die Resultate einen für nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> spezifischen und vom Alter abhängigen, proinflammatorischen Wandel bei Alzheimer-Patienten nahelegen. Anstelle des Alters wären jedoch auch Faktoren wie die Erkrankungsdauer oder im Zuge dessen der Schweregrad der Erkrankung als Ursache für die dargelegten Beobachtungen denkbar. Dies konnte jedoch nachträglich durch den Vergleich der MMST-Punktzahl als Maß kognitiver Beeinträchtigungen ausgeschlossen werden, da hier weder zwischen den Subkohorten, noch zwischen den Sub- und Gesamtkohorten signifikante Unterschiede präsent waren.

Die altersabhängigen Effekte der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> Fc N-Glykosylierung wurden im Nachhinein über Korrelationsanalysen genauer charakterisiert. Dabei konnten diverse, mit dem Alter positiv und negativ korrelierte Häufigkeiten von Fc N-Glykanen identifiziert werden (Tab. 4.1). Negative Korrelationen und dadurch mit dem Alter abnehmende Häufigkeiten zeigten sich vor allem bei jenen einzelnen und zusammengefassten Oligosacchariden, die einen hohen Sialylierungs-, Galaktosylierungs- und Fucosylierungsstatus aufwiesen.



Solche Formationen sind in der Regel mit verstärkten antiinflammatorischen Prozessen in Folge reduzierter IgG-Affinitäten zu FcγR und C1q assoziiert (Niwa *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2012; Quast *et al.*, 2015). Positiv korreliert und dadurch mit dem Alter ansteigend, waren die Häufigkeiten von Glykanen mit einem geringen Anteil Galaktose, was ein typisches Merkmal von Autoimmunerkrankungen darstellt (Tomana *et al.*, 1988; Pilkington *et al.*, 1995). Obwohl auch für das Gesamt-IgG der Alzheimer-Patienten sowie für die nAbs-Aβ<sub>42</sub> der Kontrollprobanden positive wie negative Korrelationen der Häufigkeiten aufgedeckt wurden, betrafen diese in der Regel andere Glykane als bei den Autoantikörpern. Die Korrelationsanalysen zusammengekommen deuten somit auf einen mit dem Alter zunehmenden und für IgG allgemeinen, jedoch für nAbs-Aβ<sub>42</sub> erneut spezifischen proinflammatorischen Status bei Alzheimer-Patienten hin.

**Tabelle 4.1. Altersabhängige Veränderung der Fc N-Glykosylierung.** Dargestellt sind die bei über 75-jährigen Alzheimer-Patienten (**AD**) gegenüber Kontrollprobanden (**CTR**) statistisch signifikanten Veränderungen der relativen Häufigkeiten einzelner sowie in Gruppen zusammengesetzter Glykane von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> und IgG. Darüber hinaus sind die mit dem Alter signifikant korrelierenden, relativen Häufigkeiten einzelner sowie in Gruppen zusammengesetzter Glykane der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> gezeigt. Die einzelnen Oligosaccharide (oberhalb des Trennstrichs) wurden mithilfe ihrer IUPAC Nomenklatur gekennzeichnet: F = Fucose (Fuc), A = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Galaktose (Gal), S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Die zusammengesetzten Oligosaccharide (unterhalb des Trennstrichs) wurden wie folgt deklariert: G0 bzw. G1 = Glykane ohne oder mit einer Gal, S1 = Glykane mit einer Neu5Ac, FGS = Glykane mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac. Die An- bzw. Abwesenheit von Fuc, Gal und Neu5Ac ist mit anti- bzw. proinflammatorischen Effekten assoziiert. Die funktionellen Effekte von Glykanen mit einer Kombination aus Prä- und Absenz dieser Zuckermoleküle wurden hingegen ebenso wie die An- oder Abwesenheit von GlcNAc – aufgrund kontroverser Literatur – als unbestimmt deklariert. ↓ reduzierte Häufigkeit/negative Korrelation; ↑ erhöhte Häufigkeit/positive Korrelation.

Glykan(gruppen)	Häufigkeit AD vs. CTR		Korrelation nAbs		Effekt
	nAbs	IgG	AD	CTR	
<b>A2G2</b>	↓	-	↓	-	unbestimmt
<b>A2BG2</b>	↓	-	-	-	unbestimmt
<b>FA2BG0</b>	-	-	↑	-	unbestimmt
<b>FA2G2</b>	-	-	↓	-	antiinflammatorisch
<b>FA2G1S1</b>	↓	-	↓	-	antiinflammatorisch
<b>A2G2S1</b>	-	-	-	↑	unbestimmt
<b>FA2G2S1</b>	↓	-	↓	-	antiinflammatorisch
<b>A2G2S2</b>	-	-	-	↑	unbestimmt
<b>G0</b>	-	-	↑	-	proinflammatorisch
<b>G2</b>	-	-	↓	-	antiinflammatorisch
<b>S1</b>	↓	-	↓	-	antiinflammatorisch
<b>FGS</b>	↓	-	↓	-	antiinflammatorisch

Da die altersbezogene Auswertung der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> Fc N-Glykosylierung eine Reihe signifikanter Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen und somit einen vielversprechenden diagnostischen Ansatz offenbarte, war es das Ziel, unter Berücksichtigung des Alters ein robustes, multivariates Biomarkermodell zu entwickeln, welches Zu- und Abnahmen relativer Häufigkeiten mehrerer Glykane gleichzeitig integriert.

Mithilfe eines generalisierten linearen Modells wurde so eine Formel basierend auf 13 Glykanen sowie dem Alter als Korrekturfaktor entworfen, auf deren Grundlage eine sensitive (95 %) und spezifische (100 %) Unterscheidung der 20 Kontrollprobanden und Alzheimer-Patienten möglich war. Ähnliche Herangehensweisen wurden bereits für die Identifikation von Einflussfaktoren sowie funktionellen Unterschieden im Rahmen weiterer Erkrankungen herangezogen (Guo and Lin, 2009; Wang *et al.*, 2012). Mit einem negativen Faktor assoziierte Oligosaccharide verschieben durch Zunahme ihrer relativen Häufigkeiten das Ergebnis der Formel in Richtung der Alzheimer-Patienten, was bei näherer Betrachtung nicht in allen Fällen einen nachvollziehbaren Zusammenhang aufwies. Vor dem Hintergrund, dass fucosylierte, galaktosylierte und sialylierte Glykane die FcγR- und C1q-Affinität von IgG reduzieren und somit Prozesse wie ADCP und ADCC hemmen, sind sowohl stark bis mäßig pro- (A2G0, A2BG0), als auch antiinflammatorisch assoziierte Glykane (FA2BG2, FA2G1S1) mit negativen Faktoren und folglich einer Verschiebung hin zur Erkrankung verknüpft (Kaneko *et al.*, 2006; Nimmerjahn *et al.*, 2007; Kronimus *et al.*, 2019). Das Modell beruht somit stärker auf diversen minimalen Störungen des unter physiologischen Bedingungen präzise abgestimmten Glykosylierungsmusters, als auf einer strikt pro- oder antiinflammatorischen Verschiebung. Zwar sind auch in nicht pathologischen Lebensumständen solche Veränderungen möglich, jedoch sind diese in der Regel von kurzer Dauer und führen erst in chronischen Fällen zu schädlichen immunologischen Prozessen (Gornik and Lauc, 2008; Bondt *et al.*, 2014; Ercan *et al.*, 2017).

Bei den grundsätzlichen Ursachen einer pathologischen Glykosylierung und somit auch der Veränderung des Fc N-Glykosylierungsmusters von nAbs-Aβ<sub>42</sub>, kann es sich unter anderem um genetische Faktoren und besondere Lebensumstände handeln. Das Expressionslevel sowie die Funktionalität von Glykosyltransferasen, Glykosidasen sowie weiterer in der Glykosylierungsmaschinerie involvierter Enzyme bestimmen maßgeblich die Art und Struktur der Glykane (Stanley, 2011). Mutationen in entsprechenden Genen wären somit in der Lage, ein divergentes Glykosylierungsmuster im Verlauf der Alzheimer-Krankheit zu induzieren (Yoshida *et al.*, 2001; Freeze, 2013). Darüber hinaus hat die Bereitstellung der Kohlenhydratvorläufer und somit die Ernährung eine Auswirkung auf den Glykosylierungsprozess, welcher zusätzlich über den Hormon- oder Säure-Base-Haushalt beeinflusst werden kann (Rivinoja *et al.*, 2009; Prados *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2015). Dass hierbei nAbs im Speziellen und nicht das Gesamt-IgG betroffen ist, mag an den unterschiedlichen B-Zellpopulationen liegen, denen sie entspringen.

Da natürlich vorkommende Antikörper von B1-Zellen, die den Großteil des IgG-Pools ausmachen, herkömmlichen Antikörper jedoch von B2-Zellen produziert werden und sich beide Populationen unter anderem in ihren Entwicklungspfaden, ihrer Lokalisation, sowie regulatorischen Mechanismen und Effekten unterscheiden, besteht auch die Möglichkeit, dass spezifische, die Glykosylierung betreffende Einflüsse nur auf eine der beiden Populationen einwirken (Rothstein *et al.*, 2013; Rothstein *et al.*, 2015; Baumgarth, 2016).

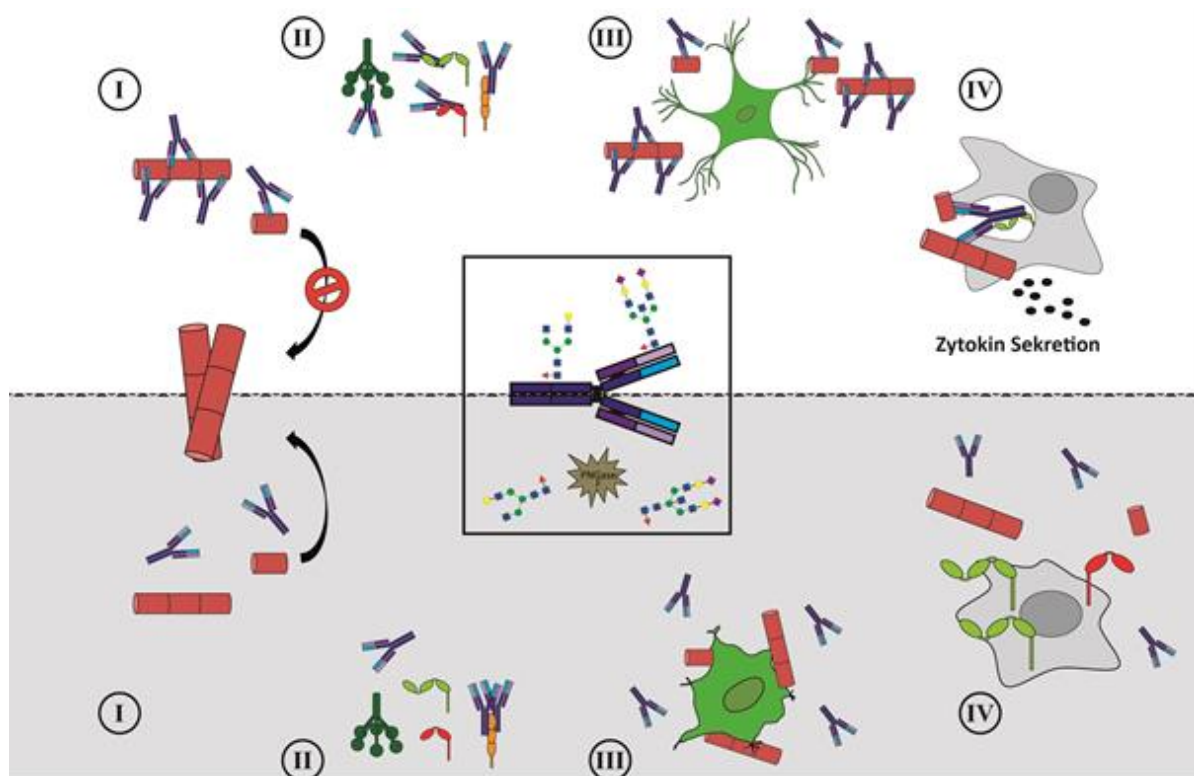
### 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte die physiologische und diagnostische Relevanz der N-Glykosylierung von nAbs-A $\beta_{42}$  bei der Alzheimer-Krankheit untersucht und charakterisiert werden. Beide Ziele wurden erfolgreich abgeschlossen und können wichtige Erkenntnisse für zukünftige therapeutische und diagnostische Strategien im Zuge der Erkrankung beisteuern.

Die funktionellen Eigenschaften der nAbs-A $\beta_{42}$ , welche bereits in vorangegangenen Studien aufgezeigt und in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurden, spielen insbesondere bei der Regulation der A $\beta_{42}$ -Proteostase durch Auslösen von Mechanismen wie der Bindung, Neutralisation sowie Phagozytose des Peptids, aber auch bei der Protektion neuronaler und mikroglialer Zellen eine entscheidende Rolle (Dodel *et al.*, 2011; Gold *et al.*, 2013; Mengel *et al.*, 2013). Aufgrund dieser regulatorischen Einflüsse auf das vermeintlich toxische Agens der Alzheimer-Krankheit, werden nAbs-A $\beta_{42}$  als entscheidender Teil eines protektiven Systems angesehen, welches der Entstehung der Erkrankung vorbeugt (Dodel *et al.*, 2002). Die Einflussnahme auf die Akkumulation und Aggregation von A $\beta_{42}$  als die pathokausalen Prozesse der Alzheimer-Krankheit, steht dabei im Vordergrund. Da eine solche A $\beta_{42}$ -Pathologie in der Regel Jahre bis Jahrzehnte vor der Manifestation erster klinischer Symptome auftritt, stellt dieser Zeitraum auch die kritische Phase für die Intervention der nAbs-A $\beta_{42}$  dar, um die gemäß Amyloid-Kaskaden-Theorie definierten, nachgeschalteten Prozesse zu verhindern (Selkoe and Hardy, 2016). Hierfür müssen die unter anderem auch im Liquor nachzuweisenden Autoantikörper cerebrale Regionen erreichen und die primär wie sekundär toxischen Eigenschaften vor allem der A $\beta_{42}$ -Oligomere eindämmen (Du *et al.*, 2001).

Deren Bindung, Neutralisation und immunzellvermittelte Beseitigung sind ebenso entscheidende Funktionen, wie die Inhibition der Aggregation akkumulierter  $A\beta_{42}$ -Monomere, und konnten allesamt in der vorliegenden Arbeit als Teil des prinzipiellen Wirkmechanismus von nAbs- $A\beta_{42}$  nachgewiesen werden. Für diese potentiell protektiven Funktionen der nAbs- $A\beta_{42}$  ist die Aufrechterhaltung ihrer physiologischen quantitativen und qualitativen Eigenschaften mutmaßlich von entscheidender Bedeutung. Veränderungen hinsichtlich solcher Merkmale können die regulatorischen Fähigkeiten der Autoantikörper erheblich beeinträchtigen, schlussendlich zu einer gestörten  $A\beta_{42}$ -Proteostase führen und damit als ätiopathologischer Faktor sogar die Entstehung bzw. Progression der Alzheimer-Krankheit begünstigen.

Bei der Fc N-Glykosylierung der nAbs- $A\beta_{42}$  handelt es sich um ein solch entscheidendes qualitatives Merkmal für deren physiologische Funktionalität, da in der vorliegenden Arbeit eine direkte Abhängigkeit der beschriebenen, protektiven Mechanismen von eben dieser aufgezeigt werden konnte. Dabei verursachte die Entfernung der N-Glykane die reduzierte Bindung an das Antigen und Rezeptoren, wodurch die Inhibition der Aggregation, die Phagozytose, die Neutralisation und Neuroprotektion und somit die entscheidenden, den Pathomechanismen der Alzheimer-Krankheit zugrundeliegenden Prozesse negativ beeinflusst werden (Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1. Veränderter Wirkmechanismus von nAbs-A $\beta_{42}$  nach Deglykosylierung.** Physiologisch glykosylierte nAbs-A $\beta_{42}$  (weiß) binden A $\beta_{42}$ -Monomere und -Oligomere und hemmen die Aggregation des Peptids (I), binden Effektorstrukturen wie C1q, Fc $\gamma$ R und DC-SIGN (II), neutralisieren A $\beta_{42}$ -Monomere und -Oligomere, wodurch die Viabilität von Neuronen und Mikrogliazellen erhöht wird (III) und induzieren die Phagozytose beider Peptidformen (IV). All diese Prozesse sind – mit Ausnahme der Bindung von DC-SIGN – nach enzymatischer Deglykosylierung reduziert oder gänzlich aufgehoben (grau). (Eigene Darstellung)

Aufgrund dieser Zusammenhänge kann den Veränderungen der Fc N-Glykosylierung der nAbs-A $\beta_{42}$  auch eine ätiologische Bedeutung zukommen, wobei sie aus oben genannten Gründen zeitgleich mit dem Startpunkt der daraus resultierenden A $\beta_{42}$ -Pathologie nachzuweisen sein müssten. Unter der Hypothese, dass sich einerseits solche Modifikationen zunächst in kleineren Verschiebungen des Musters zeigen, welche jedoch aufgrund dauerhafter Zustände bereits die Störung der physiologischen Funktion verursachen könnten, und andererseits im Zuge allgemeiner, altersabhängiger Effekte der Glykosylierung zunehmend stärker zum Vorschein kommen, wären die altersbezogenen Analysen der Glykosylierungsmuster von Kontrollprobanden und Alzheimer-Patienten zu erklären (Yamada *et al.*, 1997).

Bei diesen waren innerhalb der Alzheimer-Patienten mit dem Alter korrelierende Veränderungen der Glykosylierung spezifisch für nAbs-A $\beta_{42}$  sowie innerhalb der jüngeren geringe und innerhalb der älteren Subpopulation erhebliche Unterschiede zwischen Alzheimer-Patienten und Kontrollprobanden nachzuweisen. Darüber hinaus beruht das entworfene diagnostische Regressionsmodell auf multivariaten, moderaten Veränderungen sowie dem Alter als Korrekturfaktor.

Trotz hoher Sensitivität und Spezifität des generalisierten linearen Modells zur Identifikation von Alzheimer-Patienten ist die Rekrutierung einer größeren Validierungskohorte von Nöten. Zum einen war aufgrund des explorativen Charakters der Studie der Stichprobenumfang nicht ausreichend, um für den Trainings- und Testdatensatz auf unterschiedliche Studienteilnehmer zurückgreifen zu können. Zum anderen ist die Verifizierung des Modells gegenüber Patienten mit Autoimmun-, Demenz- und anderen neurologischen Erkrankungen hinsichtlich seiner Spezifität zu überprüfen.

Unter Berücksichtigung sämtlicher Ergebnisse zur Aufdeckung der physiologischen und diagnostischen Relevanz der nAbs Fc N-Glykosylierung bei der Alzheimer-Krankheit, können auch entscheidende Erkenntnisse für zukünftige Strategien therapeutischer Maßnahmen auf Basis von Antikörpern gewonnen werden, von denen an dieser Stelle insbesondere zwei genannt werden sollen:

1. Bislang klinisch getestete A $\beta_{42}$ -Antikörper sind in nicht seltenen Fällen mit immunologischen Nebenwirkungen assoziiert. Solche könnten wiederum durch die rekombinante Produktion der Immunglobuline hervorgerufen werden, indem die Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme trotz Humanisierung zu unphysiologischen Glykosylierungsmustern und dem Einbau artfremder Zuckerreste als Aktivatoren des Immunsystems führt (Raju, 2008; Novakovic *et al.*, 2013; Reusch and Tejada, 2015; Goh and Ng, 2018; Honig *et al.*, 2018).
2. Metabolisches oder enzymatisches Glykoengineering für die gezielte Modifikation der Glykane stellt eine Möglichkeit dar, worüber die durch das Expressionssystem verursachten Differenzen aufgehoben und gegebenenfalls sogar erwünschte Prozesse an- und unerwünschte Prozesse abgeschaltet werden können (Restelli and Butler, 2002; Giddens and Wang, 2015; Higel *et al.*, 2016; Pagan *et al.*, 2018).

Darüber hinaus birgt diese Methode im Rahmen der Präzisionsmedizin die Möglichkeit, nach Screening der Glykosylierungsmuster von Alzheimer-Patienten eine Therapie mit Antikörpern zu initiieren, welche mit individuellen und auf den Einzelfall zugeschnittenen Glykosylierungsmustern zum Abfangen der pathologischen Veränderungen verknüpft sind.

Zusätzlich zur Entwicklung eines theoretisch wirkungsvollen und nebenwirkungsarmen Antikörpers, kennzeichnen Eigenschaften wie seine Halbwertszeit oder die cerebrale Lokalisation und damit das Erreichen therapeutischer Konzentrationen in den Zielregionen weitere Anforderung einer effektiven Therapie. Die Blut-Hirn-Schranke als hochselektive Barriere für Moleküle und Stoffe ist in der Regel für größere Proteine und somit auch Antikörper undurchlässig (Ballabh *et al.*, 2004). Diese zu umgehen muss daher ebenfalls ein Hauptziel darstellen und kann unter anderem durch den Einsatz von Nanopartikeln, die Nutzung von spezifischen Transporterproteinen, aber auch durch eine Reihe weiterer biologischer, chemischer und physikalischer Ansätze erreicht werden (Pardridge, 2005; He *et al.*, 2018). Nichtsdestotrotz lassen sich bereits ca. 0,1 % der peripher zirkulierenden Immunglobuline auch im Liquor nachweisen, sodass zumindest ein kleiner Teil die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Tabrizi *et al.*, 2010; Erdo *et al.*, 2017).

Eine relativ neue Theorie setzt zudem die Entstehung der Alzheimer-Krankheit mit dem Mikrobiom in Zusammenhang (Vogt *et al.*, 2017; Mancuso and Santangelo, 2018). Eine veränderte Zusammensetzung der Bakterienkulturen wird dabei unter anderem als Ausgangspunkt einer erhöhten Permeabilität der Darmschranke – dem Analog der BBB – und daraus resultierenden, systemischen Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht, welche auch auf die neuronalen Bereiche übergreifen können. Darüber hinaus sollen bakterielle, Amyloid-ähnliche Strukturen, welche zur Zelladhäsion und zum Schutz vor der Degradation synthetisiert werden, in einem Prionen-ähnlichen Mechanismus die Aggregation und Propagation von A $\beta$  über die Darm-Hirn-Achse induzieren können, wobei unterschiedliche Zelltypen, darunter auch distale Neurone sowie Fibroblasten und andere Immunzellen involviert sind (Kowalski and Mulak, 2019). Sollten sich diese Theorien bestätigen, so könnte die A $\beta$ <sub>42</sub>-Pathologie der Alzheimer-Krankheit in der Peripherie ihren Ursprung haben, wodurch die regulatorischen Aufgaben der nAbs-A $\beta$  sowie die Wirkung A $\beta$ -spezifischer, therapeutischer Antikörper nicht ausschließlich in zentralnervösen Regionen gefragt wären.



## 5. Zusammenfassung

Die Alzheimer-Krankheit als häufigste neurodegenerative Erkrankung ist ätiopathologisch unter anderem durch die Störung der metabolischen Homöostase des Peptids Beta-Amyloid ( $A\beta_{42}$ ) gekennzeichnet. Interessanterweise finden sich im immunologischen Repertoire des Menschen natürlich vorkommende Autoantikörper wieder, welche eine  $A\beta_{42}$ -Reaktivität aufweisen (nAbs- $A\beta_{42}$ ). Ihre Existenz deutet einen die  $A\beta_{42}$ -Proteostase betreffenden, regulatorischen und somit protektiven Mechanismus an, für den die quantitativen und qualitativen Eigenschaften der Autoantikörper mutmaßlich von entscheidender Bedeutung sind. Die N-Glykosylierung als ein prinzipiell entscheidendes qualitatives Attribut von Immunglobulinen, beeinflusst unter anderem deren funktionelle Eigenschaften und könnte auch für die physiologische und somit protektive Funktion der nAbs- $A\beta_{42}$  von Relevanz sein. Gleichzeitig könnten potentielle Veränderungen der nAbs- $A\beta_{42}$  Glykosylierung einen entscheidenden Faktor der Pathologie darstellen, wodurch sie als diagnostischer Marker zur Identifikation von Alzheimer-Patienten in Frage kommen könnten.

Beide Leitgedanken wurden in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Für die nAbs konnte zum einen der protektive Effekt auf die  $A\beta_{42}$ -Pathologie nachgewiesen und zum anderen eine Abhängigkeit dieser physiologischen Wirkung von einer intakten N-Glykosylierung aufgezeigt werden. Diese Resultate liefern zudem wichtige Erkenntnisse für zukünftige therapeutische Strategien auf Basis  $A\beta_{42}$ -spezifischer Antikörper, indem sie das Muster und die Komposition der N-Glykane als entscheidende Kriterien für einen wirkungsvollen und nebenwirkungsarmen Ansatz andeuten. Mithilfe der Glykoengineering-Technologie könnten darüber hinaus auch immunologische Prozesse spezifisch moduliert werden, um pathologischen Änderungen der nAbs- $A\beta_{42}$  Glykosylierung entgegenzuwirken. Tatsächlich waren solche im Rahmen einer Kohortenstudie am Fc-Fragment der Autoantikörper von Alzheimer-Patienten nachzuweisen. Auf deren Basis konnte ein generalisiertes lineares Vorhersagemodell entwickelt werden, welches die Zuordnung der Patienten und Probanden mit einer Sensitivität von 95 % und Spezifität von 100 % ermöglichte. Die nAbs- $A\beta_{42}$  Fc N-Glykosylierung sollte somit als zukünftiger Biomarker in Betracht gezogen werden, den es gilt, in einer Validierungskohorte zu verifizieren.

## 5.1 Summary

Alzheimer's disease as the most common neurodegenerative disorder is among others etio-pathologically characterized by a disrupted metabolic homeostasis of the protein Beta-Amyloid ( $A\beta_{42}$ ). Interestingly, the human immunological repertoire contains naturally occurring autoantibodies that show  $A\beta_{42}$  reactivity (nAbs- $A\beta_{42}$ ). Their existence indicate an  $A\beta_{42}$  proteostasis concerning, regulating and thus protective mechanism, for which quantitative and qualitative properties of the autoantibodies are presumably of crucial importance. The N-glycosylation as an important qualitative feature of immunoglobulins affects among others their functional properties and may also be relevant for the physiological and protective functions of the nAbs- $A\beta_{42}$ . Simultaneously, potential alterations of the nAbs- $A\beta_{42}$  glycosylation might be an essential pathological factor, which is why they could be used as a diagnostic marker for the identification of patients suffering from Alzheimer's disease.

Both central ideas have been pursued within the present work. Regarding nAbs, on the one hand, the protective effect on  $A\beta_{42}$  pathology and on the other hand a dependence of this physiological impact on an intact N-glycosylation could be demonstrated. These results additionally provide important insights for future therapeutic strategies based on  $A\beta_{42}$  specific antibodies by suggesting the pattern and composition of N-glycans as crucial criteria for an effective approach with low side-effects. Furthermore, using glycoengineering technology, immunological processes might be specifically modulated for counteracting pathological changes of nAbs- $A\beta_{42}$  glycosylation. Actually, such alterations have been found at the Fc-fragment of autoantibodies of patients suffering from Alzheimer's disease in the course of a cohort study. Based thereon a generalized linear prediction model has been developed, that enabled the classification of patients and controls with a sensitivity of 95% and specificity of 100%. Therefore, nAbs- $A\beta_{42}$  Fc N-glycosylation should be considered as future biomarker after verifying the results in a validation cohort.

## 6. Referenzen

- Abes, R., Teillaud, J.L., 2010. Impact of glycosylation on effector functions of therapeutic IgG. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3(1): 146-157.
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E., Smith, S.O., 2010. Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol*, 17(5): 561-567.
- Albus, A., Gold, M., Bach, J.P., Burg-Roderfeld, M., Jordens, M., Kirchhein, Y., Kronimus, Y., Mengel, D., Zerr, I., Dodel, R., 2018. Extending the functional characteristics of naturally occurring autoantibodies against beta-Amyloid, Prion Protein and alpha-Synuclein. *PLoS One*, 13(8): e0202954.
- Aleksis, R., Oleskovs, F., Jaudzems, K., Pahnke, J., Biverstal, H., 2017. Structural studies of amyloid-beta peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie*, 140: 176-192.
- Alexander, M.R., Sanders, R.W., Moore, J.P., Klasse, P.J., 2015. Short communication: Virion aggregation by neutralizing and nonneutralizing antibodies to the HIV-1 envelope glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 31(11): 1160-1165.
- Allen, R.S., Kwak, J., Lokken, K.L., Haley, W.E., 2003. End-of life issues in the context of Alzheimer's disease. *Alzheimers Care Q*, 4(4): 312-330.
- Alzheimer, A., 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, 64: 146-148.
- Anand, R., Gill, K.D., Mahdi, A.A., 2014. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76 Pt A: 27-50.
- Anthony, R.M., Nimmerjahn, F., Ashline, D.J., Reinhold, V.N., Paulson, J.C., Ravetch, J.V., 2008a. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science*, 320(5874): 373-376.
- Anthony, R.M., Wermeling, F., Karlsson, M.C., Ravetch, J.V., 2008b. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(50): 19571-19578.
- Anthony, R.M., Wermeling, F., Ravetch, J.V., 2012. Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci*, 1253: 170-180.
- Armstrong, R.A., 2011. The pathogenesis of Alzheimer's disease: A reevaluation of the "amyloid cascade hypothesis". *Int J Alzheimers Dis*, 2011: 630865.
- Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., Dwek, R.A., 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*, 25: 21-50.
- Arriagada, P.V., Marzloff, K., Hyman, B.T., 1992. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(9): 1681-1688.

- Avrameas, S., Ternynck, T., Tsonis, I.A., Lymberi, P., 2007. Naturally occurring B-cell autoreactivity: A critical overview. *J Autoimmun*, 29(4): 213-218.
- Bakovic, M.P., Selman, M.H., Hoffmann, M., Rudan, I., Campbell, H., Deelder, A.M., Lauc, G., Wuhler, M., 2013. High-throughput IgG Fc N-glycosylation profiling by mass spectrometry of glycopeptides. *J Proteome Res*, 12(2): 821-831.
- Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard, M., 2004. The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 16(1): 1-13.
- Banda, N.K., Wood, A.K., Takahashi, K., Levitt, B., Rudd, P.M., Royle, L., Abrahams, J.L., Stahl, G.L., Holers, V.M., Arend, W.P., 2008. Initiation of the alternative pathway of murine complement by immune complexes is dependent on N-glycans in IgG antibodies. *Arthritis Rheum*, 58(10): 3081-3089.
- Barrera-Ocampo, A., Lopera, F., 2016. Amyloid-beta immunotherapy: The hope for Alzheimer disease? *Colomb Med (Cali)*, 47(4): 203-212.
- Bateman, R.J., Munsell, L.Y., Morris, J.C., Swarm, R., Yarasheski, K.E., Holtzman, D.M., 2006. Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med*, 12(7): 856-861.
- Bature, F., Guinn, B.A., Pang, D., Pappas, Y., 2017. Signs and symptoms preceding the diagnosis of Alzheimer's disease: A systematic scoping review of literature from 1937 to 2016. *BMJ Open*, 7(8): e015746.
- Baumgarth, N., 2016. B-1 Cell heterogeneity and the regulation of natural and antigen-induced IgM production. *Front Immunol*, 7: 324.
- Bayry, J., Bansal, K., Kazatchkine, M.D., Kaveri, S.V., 2009. DC-SIGN and alpha 2,6-sialylated IgG Fc interaction is dispensable for the anti-inflammatory activity of IVIg on human dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9): E24-E24.
- Beach, T.G., Monsell, S.E., Phillips, L.E., Kukull, W., 2012. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71(4): 266-273.
- Bekris, L.M., Yu, C.E., Bird, T.D., Tsuang, D.W., 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 23(4): 213-227.
- Besong-Agbo, D., Wolf, E., Jessen, F., Oechsner, M., Hametner, E., Poewe, W., Reindl, M., Oertel, W.H., Noelker, C., Bacher, M., Dodel, R., 2013. Naturally occurring alpha-synuclein autoantibody levels are lower in patients with Parkinson disease. *Neurology*, 80(2): 169-175.
- Bird, T.D., 1998. Alzheimer Disease Overview. In: GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Updated 2018 Dec 20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1161/>.
- Blennow, K., de Leon, M.J., Zetterberg, H., 2006. Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533): 387-403.

- Bode, D.C., Baker, M.D., Viles, J.H., 2017. Ion channel formation by amyloid-beta42 oligomers but not amyloid-beta40 in cellular membranes. *J Biol Chem*, 292(4): 1404-1413.
- Boesch, A.W., Miles, A.R., Chan, Y.N., Osei-Owusu, N.Y., Ackerman, M.E., 2017. IgG Fc variant cross-reactivity between human and rhesus macaque FcgammaRs. *MAbs*, 9(3): 455-465.
- Bohm, E., Seyfried, B.K., Dockal, M., Graninger, M., Hasslacher, M., Neurath, M., Konetschny, C., Matthiessen, P., Mitterer, A., Scheifflinger, F., 2015. Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells. *BMC Biotechnol*, 15: 87.
- Bondt, A., Rombouts, Y., Selman, M.H., Hensbergen, P.J., Reiding, K.R., Hazes, J.M., Dolhain, R.J., Wuhler, M., 2014. Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Mol Cell Proteomics*, 13(11): 3029-3039.
- Bonito-Oliva, A., Schedin-Weiss, S., Younesi, S.S., Tiiman, A., Adura, C., Paknejad, N., Brendel, M., Romin, Y., Parchem, R.J., Graff, C., Vukojevic, V., Tjernberg, L.O., Terenius, L., Winblad, B., Sakmar, T.P., Graham, W.V., 2019. Conformation-specific antibodies against multiple amyloid protofibril species from a single amyloid immunogen. *J Cell Mol Med*, 23(3): 2103-2114.
- Boyd, P.N., Lines, A.C., Patel, A.K., 1995. The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Mol Immunol*, 32(17-18): 1311-1318.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., Del Tredici, K., 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*, 112(4): 389-404.
- Britschgi, M., Olin, C.E., Johns, H.T., Takeda-Uchimura, Y., LeMieux, M.C., Rufibach, K., Rajadas, J., Zhang, H., Tomooka, B., Robinson, W.H., Clark, C.M., Fagan, A.M., Galasko, D.R., Holtzman, D.M., Jutel, M., Kaye, J.A., Lemere, C.A., Leszek, J., Li, G., Peskind, E.R., Quinn, J.F., Yesavage, J.A., Ghiso, J.A., Wyss-Coray, T., 2009. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(29): 12145-12150.
- Brockhausen, I., Schachter, H., Stanley, P., 2009. O-GalNAc Glycans. In: *Essentials of Glycobiology*, Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., (Eds.). Cold Spring Harbor (NY).
- Brothers, H.M., Gosztyla, M.L., Robinson, S.R., 2018. The Physiological Roles of Amyloid-beta peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, 10: 118.
- Bruggink, K.A., Muller, M., Kuiperij, H.B., Verbeek, M.M., 2012. Methods for analysis of amyloid-beta aggregates. *J Alzheimers Dis*, 28(4): 735-758.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., Daeron, M., 2009. Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113(16): 3716-3725.

- Burm, S.M., Zuiderwijk-Sick, E.A., t Jong, A.E., van der Putten, C., Veth, J., Kondova, I., Bajramovic, J.J., 2015. Inflammasome-induced IL-1 $\beta$  secretion in microglia is characterized by delayed kinetics and is only partially dependent on inflammatory caspases. *J Neurosci*, 35(2): 678-687.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J., Yankner, B.A., 1995.  $\beta$ -amyloid fibrils induce Tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron*, 14(4): 879-888.
- Cai, Y., An, S.S., Kim, S., 2015. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging*, 10: 1163-1172.
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., Colin-Barenque, L., 2014. Amyloid  $\beta$ : Multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 795375.
- Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J.W., Xu, H.W., Stern, D., McKhann, G., Yan, S.D., 2005. Mitochondrial A $\beta$ : A potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J*, 19(14): 2040-2041.
- Cassar, M., Kretschmar, D., 2016. Analysis of Amyloid Precursor Protein function in *Drosophila melanogaster*. *Front Mol Neurosci*, 9: 61.
- Cerf, E., Sarroukh, R., Tamamizu-Kato, S., Breydo, L., Derclaye, S., Dufrene, Y.F., Narayanaswami, V., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., Raussens, V., 2009. Antiparallel  $\beta$ -sheet: A signature structure of the oligomeric amyloid  $\beta$ -peptide. *Biochem J*, 421(3): 415-423.
- Chong, F.P., Ng, K.Y., Koh, R.Y., Chye, S.M., 2018. Tau proteins and Tauopathies in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol*, 38(5): 965-980.
- Chow, V.W., Mattson, M.P., Wong, P.C., Gleichmann, M., 2010. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med*, 12(1): 1-12.
- Chowhan, R.K., Warepam, M., Dar, T.A., Singh, L.R., 2013. Recent trends in treating neuronal proteinopathies. *Journal of Proteins and Proteomics*, 4(2): 139-148.
- Chung, S., Quarumby, V., Gao, X., Ying, Y., Lin, L., Reed, C., Fong, C., Lau, W., Qiu, Z.J., Shen, A., Vanderlaan, M., Song, A., 2012. Quantitative evaluation of fucose reducing effects in a humanized antibody on Fc $\gamma$  receptor binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activities. *MAbs*, 4(3): 326-340.
- Cimler, R., Maresova, P., Kuhnova, J., Kuca, K., 2019. Predictions of Alzheimer's disease treatment and care costs in European countries. *PLoS One*, 14(1): e0210958.
- Cizas, P., Budvytyte, R., Morkuniene, R., Moldovan, R., Broccio, M., Losche, M., Niaura, G., Valincius, G., Borutaite, V., 2010. Size-dependent neurotoxicity of  $\beta$ -amyloid oligomers. *Arch Biochem Biophys*, 496(2): 84-92.
- Co, M.S., Scheinberg, D.A., Avdalovic, N.M., McGraw, K., Vasquez, M., Caron, P.C., Queen, C., 1993. Genetically engineered deglycosylation of the variable domain increases the affinity of an anti-CD33 monoclonal antibody. *Mol Immunol*, 30(15): 1361-1367.
- Colovic, M.B., Krstic, D.Z., Lazarevic-Pasti, T.D., Bondzic, A.M., Vasic, V.M., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*, 11(3): 315-335.

- Coronel, R., Bernabeu-Zornoza, A., Palmer, C., Muniz-Moreno, M., Zambrano, A., Cano, E., Liste, I., 2018. Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and its derivatives in the biology and cell fate specification of neural stem cells. *Mol Neurobiol*, 55(9): 7107-7117.
- Crous-Bou, M., Minguillon, C., Gramunt, N., Molinuevo, J.L., 2017. Alzheimer's disease prevention: From risk factors to early intervention. *Alzheimers Res Ther*, 9(1): 71.
- Cullen, B., O'Neill, B., Evans, J.J., Coen, R.F., Lawlor, B.A., 2007. A review of screening tests for cognitive impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78(8): 790-799.
- Cunningham, E.L., McGuinness, B., Herron, B., Passmore, A.P., 2015. Dementia. *Ulster Med J*, 84(2): 79-87.
- Daeron, M., 1997. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*, 15: 203-234.
- Dalziel, M., McFarlane, I., Axford, J.S., 1999. Lectin analysis of human immunoglobulin G N-glycan sialylation. *Glycoconj J*, 16(12): 801-807.
- DaRocha-Souto, B., Scotton, T.C., Coma, M., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Sereno, L., Rodriguez, M., Sanchez, B., Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., 2011. Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/Tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70(5): 360-376.
- Davies, J., Jiang, L., Pan, L.Z., LaBarre, M.J., Anderson, D., Reff, M., 2001. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol Bioeng*, 74(4): 288-294.
- Decker, Y., Schomburg, R., Nemeth, E., Vitkin, A., Fousse, M., Liu, Y., Fassbender, K., 2016. Abnormal galactosylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*, 22(14): 1794-1803.
- den Dunnen, J., Gringhuis, S.I., Geijtenbeek, T.B., 2009. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother*, 58(7): 1149-1157.
- Deuschl, G., Maier, W., 2016. S3-Leitlinie "Demenzen" (Langversion–Januar 2016). Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN), Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) in Zusammenarbeit mit der Deutschen Alzheimer Gesellschaft e.V. –Selbsthilfe Demenz und die am Konsensusprozess beteiligten medizinisch-wissenschaftlichen Fachgesellschaften, Berufsverbände und Organisationen. AWMF-Register-Nr.: 038-013.
- Dodel, R., Balakrishnan, K., Keyvani, K., Deuster, O., Neff, F., Andrei-Selmer, L.C., Roskam, S., Stuer, C., Al-Abed, Y., Noelker, C., Balzer-Geldsetzer, M., Oertel, W., Du, Y., Bacher, M., 2011. Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: Investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 31(15): 5847-5854.
- Dodel, R., Hampel, H., Depboylu, C., Lin, S., Gao, F., Schock, S., Jackel, S., Wei, X., Buerger, K., Hoft, C., Hemmer, B., Moller, H.J., Farlow, M., Oertel, W.H., Sommer, N., Du, Y., 2002. Human antibodies against amyloid beta peptide: A potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 52(2): 253-256.

- Dodel, R., Rominger, A., Bartenstein, P., Barkhof, F., Blennow, K., Forster, S., Winter, Y., Bach, J.P., Popp, J., Alferink, J., Wiltfang, J., Buerger, K., Otto, M., Antuono, P., Jacoby, M., Richter, R., Stevens, J., Melamed, I., Goldstein, J., Haag, S., Wietek, S., Farlow, M., Jessen, F., 2013. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: A phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol*, 12(3): 233-243.
- Dodel, R.C., Du, Y., Depboylu, C., Hampel, H., Frolich, L., Haag, A., Hemmeter, U., Paulsen, S., Teipel, S.J., Brettschneider, S., Spottke, A., Nolker, C., Moller, H.J., Wei, X., Farlow, M., Sommer, N., Oertel, W.H., 2004. Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75(10): 1472-1474.
- Doody, R.S., Thomas, R.G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P.S., Siemers, E., Liu-Seifert, H., Mohs, R., Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering, C., Solanezumab Study, G., 2014. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 370(4): 311-321.
- Du, Y., Dodel, R., Hampel, H., Buerger, K., Lin, S., Eastwood, B., Bales, K., Gao, F., Moeller, H.J., Oertel, W., Farlow, M., Paul, S., 2001. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology*, 57(5): 801-805.
- Duchemin, A.M., Ernst, L.K., Anderson, C.L., 1994. Clustering of the high affinity Fc receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RI) results in phosphorylation of its associated gamma-chain. *J Biol Chem*, 269(16): 12111-12117.
- Dunn-Walters, D., Boursier, L., Spencer, J., 2000. Effect of somatic hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable regions. *Mol Immunol*, 37(3-4): 107-113.
- Durafour, B.A., Moore, C.S., Zammit, D.A., Johnson, T.A., Zaguia, F., Guiot, M.C., Bar-Or, A., Antel, J.P., 2012. Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia*, 60(5): 717-727.
- Ercan, A., Kohrt, W.M., Cui, J., Deane, K.D., Pezer, M., Yu, E.W., Hausmann, J.S., Campbell, H., Kaiser, U.B., Rudd, P.M., Lauc, G., Wilson, J.F., Finkelstein, J.S., Nigrovic, P.A., 2017. Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. *JCI Insight*, 2(4): e89703.
- Erdo, F., Denes, L., de Lange, E., 2017. Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37(1): 4-24.
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Muller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S.K., Kontoravdi, C., Weilguny, D., Andersen, M.R., 2015. Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnol Bioeng*, 112(3): 521-535.
- Feige, M.J., Nath, S., Catharino, S.R., Weinfurter, D., Steinbacher, S., Buchner, J., 2009. Structure of the murine unglycosylated IgG1 Fc fragment. *J Mol Biol*, 391(3): 599-608.



- Ferrara, C., Brunker, P., Suter, T., Moser, S., Puntener, U., Umana, P., 2006. Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: Influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng*, 93(5): 851-861.
- Ferrara, C., Grau, S., Jager, C., Sondermann, P., Brunker, P., Waldhauer, I., Hennig, M., Ruf, A., Rufer, A.C., Stihle, M., Umana, P., Benz, J., 2011. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcgammaRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(31): 12669-12674.
- Forsstrom, B., Axnas, B.B., Rockberg, J., Danielsson, H., Bohlin, A., Uhlen, M., 2015. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One*, 10(3): e0121673.
- Forthal, D.N., 2014. Functions of antibodies. *Microbiol Spectr*, 2(4): AID-0019-2014.
- Franciotta, D., Martino, G., Brambilla, E., Zardini, E., Locatelli, V., Bergami, A., Tinelli, C., Desina, G., Cosi, V., 1999. TE671 cell-based ELISA for anti-acetylcholine receptor antibody determination in myasthenia gravis. *Clin Chem*, 45(3): 400-405.
- Freeman, S.A., Grinstein, S., 2014. Phagocytosis: Receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev*, 262(1): 193-215.
- Freeze, H.H., 2013. Understanding human glycosylation disorders: Biochemistry leads the charge. *J Biol Chem*, 288(10): 6936-6945.
- Gameiro, G.R., Sinkunas, V., Liguori, G.R., Auler-Junior, J.O.C., 2018. Precision Medicine: Changing the way we think about healthcare. *Clinics (Sao Paulo)*, 73: e723.
- Gaspar, R.C., Villarreal, S.A., Bowles, N., Hepler, R.W., Joyce, J.G., Shughrue, P.J., 2010. Oligomers of beta-amyloid are sequestered into and seed new plaques in the brains of an AD mouse model. *Exp Neurol*, 223(2): 394-400.
- Gendreau, K.L., Hall, G.F., 2013. Tangles, toxicity, and Tau secretion in AD - new approaches to a vexing problem. *Front Neurol*, 4: 160.
- Giddens, J.P., Wang, L.X., 2015. Chemoenzymatic glyco-engineering of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol*, 1321: 375-387.
- Ginsburg, G.S., Phillips, K.A., 2018. Precision Medicine: From science to value. *Health Aff (Millwood)*, 37(5): 694-701.
- Goedert, M., Jakes, R., 1990. Expression of separate isoforms of human Tau protein: Correlation with the Tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*, 9(13): 4225-4230.
- Goh, J.B., Ng, S.K., 2018. Impact of host cell line choice on glycan profile. *Crit Rev Biotechnol*, 38(6): 851-867.
- Gold, M., Mengel, D., Roskam, S., Dodel, R., Bach, J.P., 2013. Mechanisms of action of naturally occurring antibodies against beta-amyloid on microglia. *J Neuroinflammation*, 10: 5.
- Gold, M., Pul, R., Bach, J.P., Stangel, M., Dodel, R., 2012. Pathogenic and physiological autoantibodies in the central nervous system. *Immunol Rev*, 248(1): 68-86.

- Goodyear, M.D., Krleza-Jeric, K., Lemmens, T., 2007. The Declaration of Helsinki. *BMJ*, 335(7621): 624-625.
- Gornik, O., Lauc, G., 2008. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*, 25(4-5): 267-278.
- Goulabchand, R., Vincent, T., Batteux, F., Eliaou, J.F., Guilpain, P., 2014. Impact of autoantibody glycosylation in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 13(7): 742-750.
- Gouras, G.K., Olsson, T.T., Hansson, O., 2015. beta-Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 12(1): 3-11.
- Grothe, M.J., Barthel, H., Sepulcre, J., Dyrba, M., Sabri, O., Teipel, S.J., Alzheimer's Disease Neuroimaging, I., 2017. In vivo staging of regional amyloid deposition. *Neurology*, 89(20): 2031-2038.
- Gu, L., Liu, C., Stroud, J.C., Ngo, S., Jiang, L., Guo, Z., 2014. Antiparallel triple-strand architecture for prefibrillar Abeta42 oligomers. *J Biol Chem*, 289(39): 27300-27313.
- Guerreiro, R., Bras, J., 2015. The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Med*, 7: 106.
- Guerrero-Munoz, M.J., Gerson, J., Castillo-Carranza, D.L., 2015. Tau oligomers: The toxic player at synapses in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*, 9: 464.
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2014. The function of Fcgamma receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol*, 14(2): 94-108.
- Gulisano, W., Melone, M., Li Puma, D.D., Tropea, M.R., Palmeri, A., Arancio, O., Grassi, C., Conti, F., Puzzo, D., 2018. The effect of amyloid-beta peptide on synaptic plasticity and memory is influenced by different isoforms, concentrations, and aggregation status. *Neurobiol Aging*, 71: 51-60.
- Guo, W., Lin, S., 2009. Generalized linear modeling with regularization for detecting common disease rare haplotype association. *Genet Epidemiol*, 33(4): 308-316.
- Hafkenscheid, L., Bondt, A., Scherer, H.U., Huizinga, T.W., Wuhrer, M., Toes, R.E., Rombouts, Y., 2017. Structural analysis of variable domain glycosylation of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis reveals the presence of highly sialylated glycans. *Mol Cell Proteomics*, 16(2): 278-287.
- Hajnoczky, G., Davies, E., Madesh, M., 2003. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 304(3): 445-454.
- Hanson, Q.M., Barb, A.W., 2015. A perspective on the structure and receptor binding properties of immunoglobulin G Fc. *Biochemistry*, 54(19): 2931-2942.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580): 353-356.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054): 184-185.

- Hartley, D.M., Walsh, D.M., Ye, C.P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P.M., Teplow, D.B., Selkoe, D.J., 1999. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci*, 19(20): 8876-8884.
- Harvey, D.J., 2011. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(17-18): 1196-1225.
- He, Q., Liu, J., Liang, J., Liu, X., Li, W., Liu, Z., Ding, Z., Tuo, D., 2018. Towards improvements for penetrating the blood-brain barrier-recent progress from a material and pharmaceutical perspective. *Cells*, 7(4).
- Herter, S., Birk, M.C., Klein, C., Gerdes, C., Umana, P., Bacac, M., 2014. Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity. *J Immunol*, 192(5): 2252-2260.
- Higel, F., Seidl, A., Sorgel, F., Friess, W., 2016. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur J Pharm Biopharm*, 100: 94-100.
- Holland, M., Takada, K., Okumoto, T., Takahashi, N., Kato, K., Adu, D., Ben-Smith, A., Harper, L., Savage, C.O., Jefferis, R., 2002. Hypogalactosylation of serum IgG in patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol*, 129(1): 183-190.
- Holodick, N.E., Rodriguez-Zhurbenko, N., Hernandez, A.M., 2017. Defining natural antibodies. *Front Immunol*, 8: 872.
- Honig, L.S., Vellas, B., Woodward, M., Boada, M., Bullock, R., Borrie, M., Hager, K., Andreasen, N., Scarpini, E., Liu-Seifert, H., Case, M., Dean, R.A., Hake, A., Sundell, K., Poole Hoffmann, V., Carlson, C., Khanna, R., Mintun, M., DeMattos, R., Selzler, K.J., Siemers, E., 2018. Trial of Solanezumab for mild dementia due to Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 378(4): 321-330.
- Houde, D., Peng, Y., Berkowitz, S.A., Engen, J.R., 2010. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics*, 9(8): 1716-1728.
- Huffman, J.E., Pucic-Bakovic, M., Klaric, L., Hennig, R., Selman, M.H., Vuckovic, F., Novokmet, M., Kristic, J., Borowiak, M., Muth, T., Polasek, O., Razdorov, G., Gornik, O., Plomp, R., Theodoratou, E., Wright, A.F., Rudan, I., Hayward, C., Campbell, H., Deelder, A.M., Reichl, U., Aulchenko, Y.S., Rapp, E., Wuhler, M., Lauc, G., 2014. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Mol Cell Proteomics*, 13(6): 1598-1610.
- Hyman, B.T., Smith, C., Buldyrev, I., Whelan, C., Brown, H., Tang, M.X., Mayeux, R., 2001. Autoantibodies to amyloid-beta and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 49(6): 808-810.
- Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R., 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 45(5): 583-595.

- Ingegnoli, F., Castelli, R., Gualtierotti, R., 2013. Rheumatoid factors: Clinical applications. *Dis Markers*, 35(6): 727-734.
- Ivins, K.J., Thornton, P.L., Rohn, T.T., Cotman, C.W., 1999. Neuronal apoptosis induced by beta-amyloid is mediated by caspase-8. *Neurobiol Dis*, 6(5): 440-449.
- Jan, A., Gokce, O., Luthi-Carter, R., Lashuel, H.A., 2008. The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. *J Biol Chem*, 283(42): 28176-28189.
- Jan, A., Hartley, D.M., Lashuel, H.A., 2010. Preparation and characterization of toxic Abeta aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat Protoc*, 5(6): 1186-1209.
- Jayam Truth, A., Dabi, A., Solieman, N., Kurukumbi, M., Kalyanam, J., 2012. Myasthenia gravis: A review. *Autoimmune Dis*, 2012: 874680.
- Jefferis, R., 2007. Antibody therapeutics: Isotype and glycoform selection. *Expert Opin Biol Ther*, 7(9): 1401-1413.
- Johnson, K.A., Fox, N.C., Sperling, R.A., Klunk, W.E., 2012. Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(4): a006213.
- Joshi, P., Turola, E., Ruiz, A., Bergami, A., Libera, D.D., Benussi, L., Giussani, P., Magnani, G., Comi, G., Legname, G., Ghidoni, R., Furlan, R., Matteoli, M., Verderio, C., 2014. Microglia convert aggregated amyloid-beta into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. *Cell Death Differ*, 21(4): 582-593.
- Jouanne, M., Rault, S., Voisin-Chiret, A.S., 2017. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur J Med Chem*, 139: 153-167.
- Juknat, A., Gao, F., Coppola, G., Vogel, Z., Kozela, E., 2019. miRNA expression profiles and molecular networks in resting and LPS-activated BV-2 microglia-Effect of cannabinoids. *PLoS One*, 14(2): e0212039.
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2006. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 313(5787): 670-673.
- Kapaki, E., Paraskevas, G.P., Zalonis, I., Zournas, C., 2003. CSF Tau protein and beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease diagnosis: Discrimination from normal ageing and other dementias in the Greek population. *Eur J Neurol*, 10(2): 119-128.
- Karch, C.M., Cruchaga, C., Goate, A.M., 2014. Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. *Neuron*, 83(1): 11-26.
- Kayed, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C.W., Necula, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J.L., Rasool, S., Gurlo, T., Butler, P., Glabe, C.G., 2007. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol Neurodegener*, 2: 18.
- Kayed, R., Lasagna-Reeves, C.A., 2013. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis*, 33 Suppl 1: S67-78.

- Kayed, R., Pensalfini, A., Margol, L., Sokolov, Y., Sarsoza, F., Head, E., Hall, J., Glabe, C., 2009. Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J Biol Chem*, 284(7): 4230-4237.
- Kessler, R.A., Mealy, M.A., Jimenez-Arango, J.A., Quan, C., Paul, F., Lopez, R., Hopkins, S., Levy, M., 2017. Anti-aquaporin-4 titer is not predictive of disease course in neuromyelitis optica spectrum disorder: A multicenter cohort study. *Mult Scler Relat Disord*, 17: 198-201.
- Kishore, U., Reid, K.B., 2000. C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, 49(1-2): 159-170.
- Kita, Y., Miura, Y., Furukawa, J., Nakano, M., Shinohara, Y., Ohno, M., Takimoto, A., Nishimura, S., 2007. Quantitative glycomics of human whole serum glycoproteins based on the standardized protocol for liberating N-glycans. *Mol Cell Proteomics*, 6(8): 1437-1445.
- Kiyoshi, M., Caaveiro, J.M., Kawai, T., Tashiro, S., Ide, T., Asaoka, Y., Hatayama, K., Tsumoto, K., 2015. Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor FcγRI. *Nat Commun*, 6: 6866.
- Klein, A.M., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., 1999. Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex. *Ann N Y Acad Sci*, 893: 314-320.
- Kojro, E., Fahrenholz, F., 2005. The non-amyloidogenic pathway: Structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem*, 38: 105-127.
- Koo, E.H., Lansbury, P.T., Jr., Kelly, J.W., 1999. Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18): 9989-9990.
- Kowalska, A., 2003. Amyloid precursor protein gene mutations responsible for early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*, 41(1): 35-40.
- Kowalski, K., Mulak, A., 2019. Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease. *J Neurogastroenterol Motil*, 25(1): 48-60.
- Krebs, M.R., Bromley, E.H., Donald, A.M., 2005. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: Localisation and implications. *J Struct Biol*, 149(1): 30-37.
- Krishnaswamy, S., Verdile, G., Groth, D., Kanyenda, L., Martins, R.N., 2009. The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 46(5-6): 282-301.
- Kronimus, Y., Albus, A., Balzer-Geldsetzer, M., Straub, S., Semler, E., Otto, M., Klotsche, J., Dodel, R., Consortium, L., Mengel, D., 2016. Naturally occurring autoantibodies against Tau protein are reduced in Parkinson's disease dementia. *PLoS One*, 11(11): e0164953.
- Kronimus, Y., Dodel, R., Galuska, S.P., Neumann, S., 2019. IgG Fc N-glycosylation: Alterations in neurologic diseases and potential therapeutic target? *J Autoimmun*, 96: 14-23.
- Kronimus, Y., Dodel, R., Neumann, S., 2018. A quantitative view on naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative diseases. *J Neurol Neuromedicine*, 3(4): 5-11.
- Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., 2002. On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra. *J Am Soc Mass Spectrom*, 13(2): 129-134.

- Kukull, W.A., Brenner, D.E., Speck, C.E., Nochlin, D., Bowen, J., McCormick, W., Teri, L., Pfanschmidt, M.L., Larson, E.B., 1994. Causes of death associated with Alzheimer disease: Variation by level of cognitive impairment before death. *J Am Geriatr Soc*, 42(7): 723-726.
- Kumar, A., Singh, A., Ekavali, 2015. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol Rep*, 67(2): 195-203.
- Kumar, A., Tsao, J.W., 2019. Alzheimer Disease. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. Updated 2018 Dec 18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11): 6448-6453.
- Lammerts van Bueren, J.J., Rispens, T., Verploegen, S., van der Palen-Merkus, T., Stapel, S., Workman, L.J., James, H., van Berkel, P.H., van de Winkel, J.G., Platts-Mills, T.A., Parren, P.W., 2011. Anti-galactose-alpha-1,3-galactose IgE from allergic patients does not bind alpha-galactosylated glycans on intact therapeutic antibody Fc domains. *Nat Biotechnol*, 29(7): 574-576.
- Larner, A.J., 2013. Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease: An update on genotype-phenotype relationships. *J Alzheimers Dis*, 37(4): 653-659.
- Lashley, T., Schott, J.M., Weston, P., Murray, C.E., Wellington, H., Keshavan, A., Foti, S.C., Foiani, M., Toombs, J., Rohrer, J.D., Heslegrave, A., Zetterberg, H., 2018. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: Progress and prospects. *Dis Model Mech*, 11(5).
- Li, H.Q., Chen, C., Dou, Y., Wu, H.J., Liu, Y.J., Lou, H.F., Zhang, J.M., Li, X.M., Wang, H., Duan, S., 2013. P2Y4 receptor-mediated pinocytosis contributes to amyloid beta-induced self-uptake by microglia. *Mol Cell Biol*, 33(21): 4282-4293.
- Lippa, C.F., Saunders, A.M., Smith, T.W., Swearer, J.M., Drachman, D.A., Ghetti, B., Nee, L., Pulaski-Salo, D., Dickson, D., Robitaille, Y., Bergeron, C., Crain, B., Benson, M.D., Farlow, M., Hyman, B.T., George-Hyslop, S.P., Roses, A.D., Pollen, D.A., 1996. Familial and sporadic Alzheimer's disease: Neuropathology cannot exclude a final common pathway. *Neurology*, 46(2): 406-412.
- Liu, C.C., Liu, C.C., Kanekiyo, T., Xu, H., Bu, G., 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*, 9(2): 106-118.
- Liu, H., May, K., 2012. Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *MAbs*, 4(1): 17-23.
- Ludwig, R.J., Vanhoorelbeke, K., Leypoldt, F., Kaya, Z., Bieber, K., McLachlan, S.M., Komorowski, L., Luo, J., Cabral-Marques, O., Hammers, C.M., Lindstrom, J.M., Lamprecht, P., Fischer, A., Riemekasten, G., Tersteeg, C., Sondermann, P., Rapoport, B., Wandinger, K.P., Probst, C., El Beidaq, A., Schmidt, E., Verkman, A., Manz, R.A., Nimmerjahn, F., 2017. Mechanisms of autoantibody-induced pathology. *Front Immunol*, 8: 603.

- Lue, L.F., Guerra, A., Walker, D.G., 2017. Amyloid beta and Tau as Alzheimer's disease blood biomarkers: Promise from new technologies. *Neurol Ther*, 6(Suppl 1): 25-36.
- Lui, J.H., Hansen, D.V., Kriegstein, A.R., 2011. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*, 146(1): 18-36.
- Lundstrom, S.L., Yang, H., Lyutvinskiy, Y., Rutishauser, D., Herukka, S.K., Soininen, H., Zubarev, R.A., 2014. Blood plasma IgG Fc glycans are significantly altered in Alzheimer's disease and progressive mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*, 38(3): 567-579.
- Lutz, H.U., 2007. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: An overview. *J Autoimmun*, 29(4): 287-294.
- Lutz, H.U., 2012. Naturally occurring antibodies. *Adv Exp Med Biol*, 750: vii-x.
- Lutz, H.U., Binder, C.J., Kaveri, S., 2009. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trends Immunol*, 30(1): 43-51.
- Maftai, M., Thurm, F., Schnack, C., Tumani, H., Otto, M., Elbert, T., Kolassa, I.T., Przybylski, M., Manea, M., von Arnim, C.A., 2013. Increased levels of antigen-bound beta-amyloid autoantibodies in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *PLoS One*, 8(7): e68996.
- Mancuso, C., Santangelo, R., 2018. Alzheimer's disease and gut microbiota modifications: The long way between preclinical studies and clinical evidence. *Pharmacol Res*, 129: 329-336.
- Marshall, R.D., 1972. Glycoproteins. *Annu Rev Biochem*, 41: 673-702.
- Marth, J.D., Grewal, P.K., 2008. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol*, 8(11): 874-887.
- Matsumura, S., Shinoda, K., Yamada, M., Yokojima, S., Inoue, M., Ohnishi, T., Shimada, T., Kikuchi, K., Masui, D., Hashimoto, S., Sato, M., Ito, A., Akioka, M., Takagi, S., Nakamura, Y., Nemoto, K., Hasegawa, Y., Takamoto, H., Inoue, H., Nakamura, S., Nabeshima, Y., Teplow, D.B., Kinjo, M., Hoshi, M., 2011. Two distinct amyloid beta-protein (Abeta) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology, and toxicity analyses. *J Biol Chem*, 286(13): 11555-11562.
- Maurer, S.V., Williams, C.L., 2017. The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with non-neuronal cells. *Front Immunol*, 8: 1489.
- McEwan, W.A., Mallery, D.L., Rhodes, D.A., Trowsdale, J., James, L.C., 2011. Intracellular antibody-mediated immunity and the role of TRIM21. *Bioessays*, 33(11): 803-809.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology*, 34(7): 939-944.
- Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D., LaFerla, F.M., 2011. The role of Tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neurosci Ther*, 17(5): 514-524.

- Mengel, D., Roskam, S., Neff, F., Balakrishnan, K., Deuster, O., Gold, M., Oertel, W.H., Bacher, M., Bach, J.P., Dodel, R., 2013. Naturally occurring autoantibodies interfere with beta-amyloid metabolism and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. *Transl Psychiatry*, 3: e236.
- Mewar, D., Wilson, A.G., 2006. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: A review. *Biomed Pharmacother*, 60(10): 648-655.
- Miller, D.J., Rodriguez, M., 1995. A monoclonal autoantibody that promotes central nervous system remyelination in a model of multiple sclerosis is a natural autoantibody encoded by germline immunoglobulin genes. *J Immunol*, 154(5): 2460-2469.
- Mimura, Y., Ashton, P.R., Takahashi, N., Harvey, D.J., Jefferis, R., 2007. Contrasting glycosylation profiles between Fab and Fc of a human IgG protein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J Immunol Methods*, 326(1-2): 116-126.
- Mishra, A.K., Mariuzza, R.A., 2018. Insights into the structural basis of antibody affinity maturation from next-generation sequencing. *Front Immunol*, 9: 117.
- Mittermayr, S., Le, G.N., Clarke, C., Millan Martin, S., Larkin, A.M., O'Gorman, P., Bones, J., 2017. Polyclonal immunoglobulin G N-glycosylation in the pathogenesis of plasma cell disorders. *J Proteome Res*, 16(2): 748-762.
- Mizushima, T., Yagi, H., Takemoto, E., Shibata-Koyama, M., Isoda, Y., Iida, S., Masuda, K., Satoh, M., Kato, K., 2011. Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells*, 16(11): 1071-1080.
- Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K., 2006. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol*, 27(9): 428-433.
- Morgan, D., 2009. The role of microglia in antibody-mediated clearance of amyloid-beta from the brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 8(1): 7-15.
- Morishima-Kawashima, M., 2014. Molecular mechanism of the intramembrane cleavage of the beta-carboxyl terminal fragment of amyloid precursor protein by gamma-secretase. *Front Physiol*, 5: 463.
- Morishima, Y., Gotoh, Y., Zieg, J., Barrett, T., Takano, H., Flavell, R., Davis, R.J., Shirasaki, Y., Greenberg, M.E., 2001. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci*, 21(19): 7551-7560.
- Murakami, K., 2014. Conformation-specific antibodies to target amyloid beta oligomers and their application to immunotherapy for Alzheimer's disease. *Biosci Biotechnol Biochem*, 78(8): 1293-1305.
- Murayama, S., Saito, Y., 2004. Neuropathological diagnostic criteria for Alzheimer's disease. *Neuropathology*, 24(3): 254-260.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J., 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403(6765): 98-103.



- Neddens, J., Temmel, M., Flunkert, S., Kerschbaumer, B., Hoeller, C., Loeffler, T., Niederkofler, V., Daum, G., Attems, J., Hutter-Paier, B., 2018. Phosphorylation of different Tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 6(1): 52.
- Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Del Tredici, K., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Haroutunian, V., Hof, P.R., Hulette, C.M., Hyman, B.T., Iwatsubo, T., Jellinger, K.A., Jicha, G.A., Kovari, E., Kukull, W.A., Leverenz, J.B., Love, S., Mackenzie, I.R., Mann, D.M., Masliah, E., McKee, A.C., Montine, T.J., Morris, J.C., Schneider, J.A., Sonnen, J.A., Thal, D.R., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Wisniewski, T., Woltjer, R.L., Beach, T.G., 2012. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71(5): 362-381.
- Neniskyte, U., Vilalta, A., Brown, G.C., 2014. Tumour necrosis factor alpha-induced neuronal loss is mediated by microglial phagocytosis. *FEBS Lett*, 588(17): 2952-2956.
- Neugroschl, J., Wang, S., 2011. Alzheimer's disease: Diagnosis and treatment across the spectrum of disease severity. *Mt Sinai J Med*, 78(4): 596-612.
- Nimmerjahn, F., Anthony, R.M., Ravetch, J.V., 2007. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(20): 8433-8437.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol*, 96: 179-204.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 8(1): 34-47.
- Niu, H., Alvarez-Alvarez, I., Guillen-Grima, F., Aguinaga-Ontoso, I., 2017. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurologia*, 32(8): 523-532.
- Niwa, R., Natsume, A., Uehara, A., Wakitani, M., Iida, S., Uchida, K., Satoh, M., Shitara, K., 2005. IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *J Immunol Methods*, 306(1-2): 151-160.
- Noris, M., Remuzzi, G., 2013. Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol*, 33(6): 479-492.
- Novakovic, D., Feligioni, M., Scaccianoce, S., Caruso, A., Piccinin, S., Schepisi, C., Errico, F., Mercuri, N.B., Nicoletti, F., Nistico, R., 2013. Profile of gantenerumab and its potential in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther*, 7: 1359-1364.
- Nowrangi, M.A., Lyketsos, C.G., Rosenberg, P.B., 2015. Principles and management of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's dementia. *Alzheimers Res Ther*, 7(1): 12.
- Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M., 2000. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today*, 21(12): 624-630.
- Ofek, G., Guenaga, F.J., Schief, W.R., Skinner, J., Baker, D., Wyatt, R., Kwong, P.D., 2010. Elicitation of structure-specific antibodies by epitope scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(42): 17880-17887.

- Olivares, D., Deshpande, V.K., Shi, Y., Lahiri, D.K., Greig, N.H., Rogers, J.T., Huang, X., 2012. N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *Curr Alzheimer Res*, 9(6): 746-758.
- Ostrowitzki, S., Lasser, R.A., Dorflinger, E., Scheltens, P., Barkhof, F., Nikolcheva, T., Ashford, E., Retout, S., Hofmann, C., Delmar, P., Klein, G., Andjelkovic, M., Dubois, B., Boada, M., Blennow, K., Santarelli, L., Fontoura, P., Investigators, S.C.R., 2017. A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 9(1): 95.
- Pagan, J.D., Kitaoka, M., Anthony, R.M., 2018. Engineered sialylation of pathogenic antibodies in vivo attenuates autoimmune disease. *Cell*, 172(3): 564-577 e513.
- Pardridge, W.M., 2005. The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2(1): 3-14.
- Parekh, R.B., Dwek, R.A., Sutton, B.J., Fernandes, D.L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T.W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., et al., 1985. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 316(6027): 452-457.
- Parihar, M.S., Brewer, G.J., 2010. Amyloid-beta as a modulator of synaptic plasticity. *J Alzheimers Dis*, 22(3): 741-763.
- Perchiacca, J.M., Ladiwala, A.R., Bhattacharya, M., Tessier, P.M., 2012. Structure-based design of conformation- and sequence-specific antibodies against amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(1): 84-89.
- Perez, M., Cuadros, R., Benitez, M.J., Jimenez, J.S., 2004. Interaction of Alzheimer's disease amyloid beta peptide fragment 25-35 with Tau protein, and with a Tau peptide containing the microtubule binding domain. *J Alzheimers Dis*, 6(5): 461-467.
- Perl, D.P., 2010. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*, 77(1): 32-42.
- Peschke, B., Keller, C.W., Weber, P., Quast, I., Lunemann, J.D., 2017. Fc-Galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Front Immunol*, 8: 646.
- Piaceri, I., Nacmias, B., Sorbi, S., 2013. Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*, 5: 167-177.
- Piechotta, A., Parthier, C., Kleinschmidt, M., Gnoth, K., Pillot, T., Lues, I., Demuth, H.U., Schilling, S., Rahfeld, J.U., Stubbs, M.T., 2017. Structural and functional analyses of pyroglutamate-amyloid-beta-specific antibodies as a basis for Alzheimer immunotherapy. *J Biol Chem*, 292(30): 12713-12724.
- Pieper, K., Grimbacher, B., Eibel, H., 2013. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*, 131(4): 959-971.
- Pilkington, C., Yeung, E., Isenberg, D., Lefvert, A.K., Rook, G.A., 1995. Agalactosyl IgG and antibody specificity in rheumatoid arthritis, tuberculosis, systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis. *Autoimmunity*, 22(2): 107-111.

- Pini, L., Pievani, M., Bocchetta, M., Altomare, D., Bosco, P., Cavedo, E., Galluzzi, S., Marizzoni, M., Frisoni, G.B., 2016. Brain atrophy in Alzheimer's disease and aging. *Ageing Res Rev*, 30: 25-48.
- Placido, A.I., Pereira, C.M., Duarte, A.I., Candeias, E., Correia, S.C., Santos, R.X., Carvalho, C., Cardoso, S., Oliveira, C.R., Moreira, P.I., 2014. The role of endoplasmic reticulum in amyloid precursor protein processing and trafficking: Implications for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1842(9): 1444-1453.
- Plomp, R., Dekkers, G., Rombouts, Y., Visser, R., Koeleman, C.A., Kammeijer, G.S., Jansen, B.C., Rispen, T., Hensbergen, P.J., Vidarsson, G., Wuhler, M., 2015. Hinge-region O-glycosylation of human immunoglobulin G3 (IgG3). *Mol Cell Proteomics*, 14(5): 1373-1384.
- Podcasy, J.L., Epperson, C.N., 2016. Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues Clin Neurosci*, 18(4): 437-446.
- Powell, A.K., Harvey, D.J., 1996. Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10(9): 1027-1032.
- Prados, M.B., La Blunda, J., Szekeres-Bartho, J., Caramelo, J., Miranda, S., 2011. Progesterone induces a switch in oligosaccharyltransferase isoform expression: Consequences on IgG N-glycosylation. *Immunol Lett*, 137(1-2): 28-37.
- Prins, N.D., Scheltens, P., 2013. Treating Alzheimer's disease with monoclonal antibodies: Current status and outlook for the future. *Alzheimers Res Ther*, 5(6): 56.
- Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S.S., Ransohoff, R.M., 2011. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 14(10): 1227-1235.
- Probstel, A.K., Sanderson, N.S., Derfuss, T., 2015. B Cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*, 16(7): 16576-16592.
- Qu, B.X., Gong, Y., Moore, C., Fu, M., German, D.C., Chang, L.Y., Rosenberg, R., Diaz-Arrastia, R., 2014. Beta-amyloid auto-antibodies are reduced in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, 274(1-2): 168-173.
- Quast, I., Keller, C.W., Maurer, M.A., Giddens, J.P., Tackenberg, B., Wang, L.X., Munz, C., Nimmerjahn, F., Dalakas, M.C., Lunemann, J.D., 2015. Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *J Clin Invest*, 125(11): 4160-4170.
- Rahimi, F., Shanmugam, A., Bitan, G., 2008. Structure-function relationships of pre-fibrillar protein assemblies in Alzheimer's disease and related disorders. *Curr Alzheimer Res*, 5(3): 319-341.
- Raju, T.S., 2008. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol*, 20(4): 471-478.
- Reddy, P.H., Beal, M.F., 2008. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: Implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*, 14(2): 45-53.

- Reitz, C., 2012. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: A critical review. *Int J Alzheimers Dis*, 2012: 369808.
- Reitz, C., Brayne, C., Mayeux, R., 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 7(3): 137-152.
- Reitz, C., Mayeux, R., 2014. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*, 88(4): 640-651.
- Religa, D., Fereshtehnejad, S.M., Cermakova, P., Edlund, A.K., Garcia-Ptacek, S., Granqvist, N., Hallback, A., Kawe, K., Farahmand, B., Kilander, L., Mattsson, U.B., Nagga, K., Nordstrom, P., Wijk, H., Wimo, A., Winblad, B., Eriksdotter, M., 2015. SveDem, the Swedish Dementia Registry - a tool for improving the quality of diagnostics, treatment and care of dementia patients in clinical practice. *PLoS One*, 10(2): e0116538.
- Religa, D., Laudon, H., Styczynska, M., Winblad, B., Naslund, J., Haroutunian, V., 2003. Amyloid beta pathology in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 160(5): 867-872.
- Relkin, N.R., Szabo, P., Adamiak, B., Burgut, T., Monthe, C., Lent, R.W., Younkin, S., Younkin, L., Schiff, R., Weksler, M.E., 2009. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 30(11): 1728-1736.
- Relkin, N.R., Thomas, R.G., Rissman, R.A., Brewer, J.B., Rafii, M.S., van Dyck, C.H., Jack, C.R., Sano, M., Knopman, D.S., Raman, R., Szabo, P., Gelmont, D.M., Fritsch, S., Aisen, P.S., Alzheimer's Disease Cooperative, S., 2017. A phase 3 trial of IV immunoglobulin for Alzheimer disease. *Neurology*, 88(18): 1768-1775.
- Restelli, V., Butler, M., 2002. The Effect of Cell Culture Parameters on Protein Glycosylation. In: *Cell Engineering: Glycosylation*, Al-Rubeai, M., (Ed.). Springer Netherlands, Dordrecht: pp: 61-92.
- Reusch, D., Tejada, M.L., 2015. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology*, 25(12): 1325-1334.
- Riccioli, A., Filippini, A., De Cesaris, P., Barbacci, E., Stefanini, M., Starace, G., Ziparo, E., 1995. Inflammatory mediators increase surface expression of integrin ligands, adhesion to lymphocytes, and secretion of interleukin 6 in mouse Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(13): 5808-5812.
- Rinne, J.O., Brooks, D.J., Rossor, M.N., Fox, N.C., Bullock, R., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Blennow, K., Barakos, J., Okello, A.A., Rodriguez Martinez de Liano, S., Liu, E., Koller, M., Gregg, K.M., Schenk, D., Black, R., Grundman, M., 2010. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: A phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol*, 9(4): 363-372.
- Ritchie, C., Smailagic, N., Noel-Storr, A.H., Ukoumunne, O., Ladds, E.C., Martin, S., 2017. CSF Tau and the CSF Tau/ABeta ratio for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev*, 3: CD010803.

- Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., Kellokumpu, S., 2009. Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J Cell Physiol*, 220(1): 144-154.
- Robinett, R.A., Guan, N., Lux, A., Biburger, M., Nimmerjahn, F., Meyer, A.S., 2018. Dissecting FcγR regulation through a multivalent binding model. *Cell Syst*, 7(1): 41-48 e45.
- Rosales, C., Uribe-Querol, E., 2017. Phagocytosis: A fundamental process in immunity. *Biomed Res Int*, 2017: 9042851.
- Rosenmann, H., Meiner, Z., Geylis, V., Abramsky, O., Steinitz, M., 2006. Detection of circulating antibodies against Tau protein in its unphosphorylated and in its neurofibrillary tangles-related phosphorylated state in Alzheimer's disease and healthy subjects. *Neurosci Lett*, 410(2): 90-93.
- Rosetti, F., Tsuboi, N., Chen, K., Nishi, H., Hernandez, T., Sethi, S., Croce, K., Stavrakis, G., Alcocer-Varela, J., Gomez-Martin, D., van Rooijen, N., Kyttaris, V.C., Lichtman, A.H., Tsokos, G.C., Mayadas, T.N., 2012. Human lupus serum induces neutrophil-mediated organ damage in mice that is enabled by Mac-1 deficiency. *J Immunol*, 189(7): 3714-3723.
- Rothstein, T.L., Griffin, D.O., Holodick, N.E., Quach, T.D., Kaku, H., 2013. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci*, 1285: 97-114.
- Rothstein, T.L., Herzenberg, L.A., Holodick, N.E., Ghosn, E., 2015. B-1 cell development and function. *Ann N Y Acad Sci*, 1362: v-vi.
- Rusnakova, S., Daniel, P., Chladek, J., Jurak, P., Rektor, I., 2011. The executive functions in frontal and temporal lobes: A flanker task intracerebral recording study. *J Clin Neurophysiol*, 28(1): 30-35.
- Sadigh-Eteghad, S., Sabermarouf, B., Majdi, A., Talebi, M., Farhoudi, M., Mahmoudi, J., 2015. Amyloid-beta: A crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract*, 24(1): 1-10.
- Sakono, M., Zako, T., 2010. Amyloid oligomers: Formation and toxicity of Aβ oligomers. *FEBS J*, 277(6): 1348-1358.
- Salahuddin, P., Fatima, M.T., Abdelhameed, A.S., Nusrat, S., Khan, R.H., 2016. Structure of amyloid oligomers and their mechanisms of toxicities: Targeting amyloid oligomers using novel therapeutic approaches. *Eur J Med Chem*, 114: 41-58.
- Salloway, S., Sperling, R., Gilman, S., Fox, N.C., Blennow, K., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Doody, R., van Dyck, C.H., Mulnard, R., Barakos, J., Gregg, K.M., Liu, E., Lieberburg, I., Schenk, D., Black, R., Grundman, M., Bapineuzumab 201 Clinical Trial, I., 2009. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 73(24): 2061-2070.
- Schilling, L.P., Zimmer, E.R., Shin, M., Leuzy, A., Pascoal, T.A., Benedet, A.L., Borelli, W.V., Palmi, A., Gauthier, S., Rosa-Neto, P., 2016. Imaging Alzheimer's disease pathophysiology with PET. *Dement Neuropsychol*, 10(2): 79-90.
- Schilling, T., Eder, C., 2011. Amyloid-beta-induced reactive oxygen species production and priming are differentially regulated by ion channels in microglia. *J Cell Physiol*, 226(12): 3295-3302.

- Schroeder, H.W., Jr., Cavacini, L., 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2): S41-52.
- Schuerwegh, A.J., Dombrecht, E.J., Stevens, W.J., Van Offel, J.F., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., 2003. Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage*, 11(9): 681-687.
- Schwartz-Albiez, R., Laban, S., Eichmuller, S., Kirschfink, M., 2008. Cytotoxic natural antibodies against human tumours: An option for anti-cancer immunotherapy? *Autoimmun Rev*, 7(6): 491-495.
- Self, S.E., 2010. Autoantibody testing for autoimmune disease. *Clin Chest Med*, 31(3): 415-422.
- Selkoe, D.J., 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6(4): 487-498.
- Selkoe, D.J., Hardy, J., 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8(6): 595-608.
- Selman, M.H., Niks, E.H., Titulaer, M.J., Verschuuren, J.J., Wuhler, M., Deelder, A.M., 2011. IgG fc N-glycosylation changes in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and myasthenia gravis. *J Proteome Res*, 10(1): 143-152.
- Sengupta, U., Nilson, A.N., Kaye, R., 2016. The role of amyloid-beta oligomers in toxicity, propagation, and immunotherapy. *EBioMedicine*, 6: 42-49.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussiere, T., Weinreb, P.H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O'Gorman, J., Qian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M.S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R.H., Arnold, H.M., Engber, T., Rhodes, K., Ferrero, J., Hang, Y., Mikulskis, A., Grimm, J., Hock, C., Nitsch, R.M., Sandrock, A., 2016. The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537(7618): 50-56.
- Sharma, N., Singh, A.N., 2016. Exploring biomarkers for Alzheimer's disease. *J Clin Diagn Res*, 10(7): KE01-06.
- Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H., Presta, L.G., 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*, 277(30): 26733-26740.
- Shoenfeld, Y., Meroni, P.L., Gershwin, M., 2014. Autoantibodies. 3rd edition Edn.: Amsterdam: Elsevier.
- Sinha, S., Lieberburg, I., 1999. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20): 11049-11053.
- Sjowall, C., Zapf, J., von Lohneysen, S., Magorivska, I., Biermann, M., Janko, C., Winkler, S., Bilyy, R., Schett, G., Herrmann, M., Munoz, L.E., 2015. Altered glycosylation of complexed native IgG molecules is associated with disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 24(6): 569-581.

- Smith, T.J., Olson, N.H., Cheng, R.H., Liu, H., Chase, E.S., Lee, W.M., Leippe, D.M., Mosser, A.G., Rueckert, R.R., Baker, T.S., 1993. Structure of human rhinovirus complexed with Fab fragments from a neutralizing antibody. *J Virol*, 67(3): 1148-1158.
- Solimena, M., Folli, F., Aparisi, R., Pozza, G., De Camilli, P., 1990. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med*, 322(22): 1555-1560.
- Southwell, A.L., Patterson, P.H., 2010. Antibody therapy in neurodegenerative disease. *Rev Neurosci*, 21(4): 273-287.
- Squire, L.R., Genzel, L., Wixted, J.T., Morris, R.G., 2015. Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(8): a021766.
- Sriram, K., O'Callaghan, J.P., 2007. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2(2): 140-153.
- Stancu, I.C., Vasconcelos, B., Terwel, D., Dewachter, I., 2014. Models of beta-amyloid induced Tau-pathology: The long and "folded" road to understand the mechanism. *Mol Neurodegener*, 9: 51.
- Stanley, P., 2011. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(4).
- Stanley, P., Schachter, H., Taniguchi, N., 2009. N-Glycans. In: *Essentials of Glycobiology*, and Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., (Eds.). Cold Spring Harbor (NY).
- Su, Y., Chang, P.T., 2001. Acidic pH promotes the formation of toxic fibrils from beta-amyloid peptide. *Brain Res*, 893(1-2): 287-291.
- Szabo, Z., Guttman, A., Karger, B.L., 2010. Rapid release of N-linked glycans from glycoproteins by pressure-cycling technology. *Anal Chem*, 82(6): 2588-2593.
- Tabrizi, M., Bornstein, G.G., Suria, H., 2010. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. *AAPS J*, 12(1): 33-43.
- Tachibana, H., Kim, J.Y., Shirahata, S., 1997. Building high affinity human antibodies by altering the glycosylation on the light chain variable region in N-acetylglucosamine-supplemented hybridoma cultures. *Cytotechnology*, 23(1-3): 151-159.
- Takata, K., Hirata-Fukae, C., Becker, A.G., Chishiro, S., Gray, A.J., Nishitomi, K., Franz, A.H., Sakaguchi, G., Kato, A., Mattson, M.P., Laferla, F.M., Aisen, P.S., Kitamura, Y., Matsuoka, Y., 2007. Deglycosylated anti-amyloid beta antibodies reduce microglial phagocytosis and cytokine production while retaining the capacity to induce amyloid beta sequestration. *Eur J Neurosci*, 26(9): 2458-2468.
- Taplin, C.E., Barker, J.M., 2008. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*, 41(1): 11-18.
- Tarawneh, R., Holtzman, D.M., 2012. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(5): a006148.
- Teles-Grilo Ruivo, L.M., Mellor, J.R., 2013. Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Front Synaptic Neurosci*, 5: 2.

- Tenreiro, S., Eckermann, K., Outeiro, T.F., 2014. Protein phosphorylation in neurodegeneration: Friend or foe? *Front Mol Neurosci*, 7: 42.
- Texido, L., Martin-Satue, M., Alberdi, E., Solsona, C., Matute, C., 2011. Amyloid beta peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium*, 49(3): 184-190.
- Thal, D.R., Braak, H., 2005. Post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Pathologie*, 26(3): 201-213.
- Thermo Fisher Scientific. How a Flow Cytometer Works (25.01.2019). In: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>
- Todd, S., Barr, S., Passmore, A.P., 2013. Cause of death in Alzheimer's disease: A cohort study. *QJM*, 106(8): 747-753.
- Tomana, M., Schrohenloher, R.E., Koopman, W.J., Alarcon, G.S., Paul, W.A., 1988. Abnormal glycosylation of serum IgG from patients with chronic inflammatory diseases. *Arthritis Rheum*, 31(3): 333-338.
- Tomaskova, H., Kuhnova, J., Cimler, R., Dolezal, O., Kuca, K., 2016. Prediction of population with Alzheimer's disease in the European Union using a system dynamics model. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12: 1589-1598.
- Tortola, L., Yadava, K., Bachmann, M.F., Muller, C., Kisielow, J., Kopf, M., 2010. IL-21 induces death of marginal zone B cells during chronic inflammation. *Blood*, 116(24): 5200-5207.
- Tseng, B.P., Green, K.N., Chan, J.L., Blurton-Jones, M., LaFerla, F.M., 2008. Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and Tau accumulation. *Neurobiol Aging*, 29(11): 1607-1618.
- Umare, V., Pradhan, V., Nadkar, M., Rajadhyaksha, A., Patwardhan, M., Ghosh, K.K., Nadkarni, A.H., 2014. Effect of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF-alpha, and IL-1beta) on clinical manifestations in Indian SLE patients. *Mediators Inflamm*, 2014: 385297.
- Valliere-Douglass, J.F., Eakin, C.M., Wallace, A., Ketchem, R.R., Wang, W., Treuheit, M.J., Balland, A., 2010. Glutamine-linked and non-consensus asparagine-linked oligosaccharides present in human recombinant antibodies define novel protein glycosylation motifs. *J Biol Chem*, 285(21): 16012-16022.
- Valliere-Douglass, J.F., Kodama, P., Mujacic, M., Brady, L.J., Wang, W., Wallace, A., Yan, B., Reddy, P., Treuheit, M.J., Balland, A., 2009. Asparagine-linked oligosaccharides present on a non-consensus amino acid sequence in the CH1 domain of human antibodies. *J Biol Chem*, 284(47): 32493-32506.
- van de Bovenkamp, F.S., Derksen, N.I.L., Ooijevaar-de Heer, P., van Schie, K.A., Kruithof, S., Berkowska, M.A., van der Schoot, C.E., H, I.J., van der Burg, M., Gils, A., Hafkenscheid, L., Toes, R.E.M., Rombouts, Y., Plomp, R., Wuhrer, M., van Ham, S.M., Vidarsson, G., Rispen, T., 2018. Adaptive antibody diversification through N-linked glycosylation of the immunoglobulin variable region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(8): 1901-1906.



- van de Bovenkamp, F.S., Hafkenscheid, L., Rispens, T., Rombouts, Y., 2016. The emerging importance of IgG Fab glycosylation in immunity. *J Immunol*, 196(4): 1435-1441.
- van der Flier, W.M., Scheltens, P., 2005. Epidemiology and risk factors of dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76 Suppl 5: v2-7.
- Vaysburd, M., Watkinson, R.E., Cooper, H., Reed, M., O'Connell, K., Smith, J., Cruickshanks, J., James, L.C., 2013. Intracellular antibody receptor TRIM21 prevents fatal viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(30): 12397-12401.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol*, 5: 520.
- Vina, J., Lloret, A., 2010. Why women have more Alzheimer's disease than men: Gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2: S527-533.
- Vitali, P., Migliaccio, R., Agosta, F., Rosen, H.J., Geschwind, M.D., 2008. Neuroimaging in dementia. *Semin Neurol*, 28(4): 467-483.
- Vitvitsky, V.M., Garg, S.K., Keep, R.F., Albin, R.L., Banerjee, R., 2012. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1822(11): 1671-1681.
- Vogelpoel, L.T., Baeten, D.L., de Jong, E.C., den Dunnen, J., 2015. Control of cytokine production by human fc gamma receptors: Implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front Immunol*, 6: 79.
- Vogt, N.M., Kerby, R.L., Dill-McFarland, K.A., Harding, S.J., Merluzzi, A.P., Johnson, S.C., Carlsson, C.M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Bendlin, B.B., Rey, F.E., 2017. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 7(1): 13537.
- Vollmers, H.P., Brandlein, S., 2009. Natural antibodies and cancer. *N Biotechnol*, 25(5): 294-298.
- von Bernhardi, R., Tichauer, J.E., Eugenin, J., 2010. Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 112(5): 1099-1114.
- Wang, H.C., Yu, Y.Z., Liu, S., Zhao, M., Xu, Q., 2016. Peripherally administered sera antibodies recognizing amyloid-beta oligomers mitigate Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3x Tg-AD mice. *Vaccine*, 34(15): 1758-1766.
- Wang, J., Balog, C.I., Stavenhagen, K., Koeleman, C.A., Scherer, H.U., Selman, M.H., Deelder, A.M., Huizinga, T.W., Toes, R.E., Wuhler, M., 2011. Fc-glycosylation of IgG1 is modulated by B-cell stimuli. *Mol Cell Proteomics*, 10(5): M110 004655.
- Wang, J., Gu, B.J., Masters, C.L., Wang, Y.J., 2017. A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-beta metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol*, 13(10): 612-623.
- Wang, X.F., Jiang, Z., Daly, J.J., Yue, G.H., 2012. A generalized regression model for region of interest analysis of fMRI data. *Neuroimage*, 59(1): 502-510.
- Ward, S.M., Himmelstein, D.S., Lancia, J.K., Binder, L.I., 2012. Tau oligomers and Tau toxicity in neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans*, 40(4): 667-671.

- Warrington, A.E., Van Keulen, V., Pease, L.R., Rodriguez, M., 2012. Naturally occurring antibodies as therapeutics for neurologic disease: Can human monoclonal IgMs replace the limited resource IVIG? *Adv Exp Med Biol*, 750: 44-55.
- Wee Yong, V., 2010. Inflammation in neurological disorders: A help or a hindrance? *Neuroscientist*, 16(4): 408-420.
- Wei, X., Roettger, Y., Tan, B., He, Y., Dodel, R., Hampel, H., Wei, G., Haney, J., Gu, H., Johnstone, B.H., Liu, J., Farlow, M.R., Du, Y., 2012. Human anti-prion antibodies block prion peptide fibril formation and neurotoxicity. *J Biol Chem*, 287(16): 12858-12866.
- Weller, J., Budson, A., 2018. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*, 7.
- Wildsmith, K.R., Holley, M., Savage, J.C., Skerrett, R., Landreth, G.E., 2013. Evidence for impaired amyloid beta clearance in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 5(4): 33.
- Wong, A.H., Fukami, Y., Sudo, M., Kokubun, N., Hamada, S., Yuki, N., 2016. Sialylated IgG-Fc: A novel biomarker of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 87(3): 275-279.
- Wopereis, S., Lefeber, D.J., Morava, E., Wevers, R.A., 2006. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A review. *Clin Chem*, 52(4): 574-600.
- Wuhrer, M., Selman, M.H., McDonnell, L.A., Kumpfel, T., Derfuss, T., Khademi, M., Olsson, T., Hohlfeld, R., Meinl, E., Krumbholz, M., 2015. Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Neuroinflammation*, 12: 235.
- Yamada, E., Tsukamoto, Y., Sasaki, R., Yagyu, K., Takahashi, N., 1997. Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. *Glycoconj J*, 14(3): 401-405.
- Yasmeen, A., Ringe, R., Derking, R., Cupo, A., Julien, J.P., Burton, D.R., Ward, A.B., Wilson, I.A., Sanders, R.W., Moore, J.P., Klasse, P.J., 2014. Differential binding of neutralizing and non-neutralizing antibodies to native-like soluble HIV-1 Env trimers, uncleaved Env proteins, and monomeric subunits. *Retrovirology*, 11: 41.
- Yoshida, A., Kobayashi, K., Manya, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., Herrmann, R., Straub, V., Talim, B., Voit, T., Topaloglu, H., Toda, T., Endo, T., 2001. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell*, 1(5): 717-724.
- Yu, X., Vasiljevic, S., Mitchell, D.A., Crispin, M., Scanlan, C.N., 2013. Dissecting the molecular mechanism of IVlg therapy: The interaction between serum IgG and DC-SIGN is independent of antibody glycoform or Fc domain. *J Mol Biol*, 425(8): 1253-1258.
- Zeineddine, R., Yerbury, J.J., 2015. The role of macropinocytosis in the propagation of protein aggregation associated with neurodegenerative diseases. *Front Physiol*, 6: 277.
- Zhang, D., Chen, B., Wang, Y., Xia, P., He, C., Liu, Y., Zhang, R., Zhang, M., Li, Z., 2016a. Disease-specific IgG Fc N-glycosylation as personalized biomarkers to differentiate gastric cancer from benign gastric diseases. *Sci Rep*, 6: 25957.









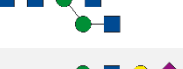

- Zhang, P., Woen, S., Wang, T., Liao, B., Zhao, S., Chen, C., Yang, Y., Song, Z., Wormald, M.R., Yu, C., Rudd, P.M., 2016b. Challenges of glycosylation analysis and control: An integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discov Today*, 21(5): 740-765.
- Zhang, Y.W., Thompson, R., Zhang, H., Xu, H., 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, 4: 3.
- Zhao, J., Nussinov, R., Ma, B., 2017. Mechanisms of recognition of amyloid-beta (A $\beta$ ) monomer, oligomer, and fibril by homologous antibodies. *J Biol Chem*, 292(44): 18325-18343.
- Zhao, L.N., Long, H., Mu, Y., Chew, L.Y., 2012. The toxicity of amyloid beta oligomers. *Int J Mol Sci*, 13(6): 7303-7327.
- Zhou, R., Yang, G., Guo, X., Zhou, Q., Lei, J., Shi, Y., 2019. Recognition of the amyloid precursor protein by human gamma-secretase. *Science*, 363(6428).
- Zou, G., Ochiai, H., Huang, W., Yang, Q., Li, C., Wang, L.X., 2011. Chemoenzymatic synthesis and Fc $\gamma$  receptor binding of homogeneous glycoforms of antibody Fc domain. Presence of a bisecting sugar moiety enhances the affinity of Fc to Fc $\gamma$ IIIa receptor. *J Am Chem Soc*, 133(46): 18975-18991.

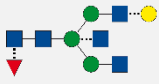
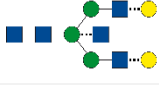








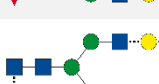

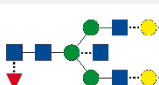
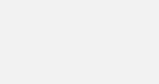
## 7. Anhang

### 7.1 Weitere Statistik und Experimente

#### 7.1.1 Statistische Auswertung der N-Glykosylierung von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>

**Tabelle A1. Statistischer Vergleich der Fab und Fc N-Glykosylierung von IVIg und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>.** Dargestellt sind die *p*-Werte nach Anwendung statistischer Tests zur Überprüfung unterschiedlicher relativer Häufigkeiten einzelner Glykane. Die Oligosaccharide wurden mithilfe ihrer Nummerierung sowie der IUPAC Nomenklatur gekennzeichnet: F = Fucose (Fuc), A = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Galaktose (Gal), S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Darüber hinaus wurden die zusammengefassten Glykane mit (F1) oder ohne (F0) Fuc, mit (B1) oder ohne (B0) b-GlcNAc, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Gal sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) Neu5Ac analysiert. N.a. = nicht auswertbar.

Struktur	IUPAC	<i>p</i> -Wert			
		IVIg	nAbs	Fc	Fab
		Fc vs. Fab	Fc vs. Fab	IVIg vs. nAbs	IVIg vs. nAbs
① 	A2G0	0,023	< 0,001	0,033	n.a.
② 	FA2G0	0,000	0,001	0,158	0,212
③ 	A2G1	< 0,001	0,001	0,932	n.a.
④ 	A2BG0	0,730	0,029	0,111	n.a.
⑤ 	FA2G1	0,016	< 0,001	0,494	0,114
⑥ 	A2G2	< 0,001	0,009	0,524	n.a.
⑦ 	FA2BG0	0,001	< 0,001	0,945	n.a.
⑧ 	A2BG1	0,001	0,002	0,624	n.a.
⑨ 	A2G1S1	0,730	0,140	0,730	n.a.
⑩ 	FA2G2	< 0,001	0,001	0,580	n.a.

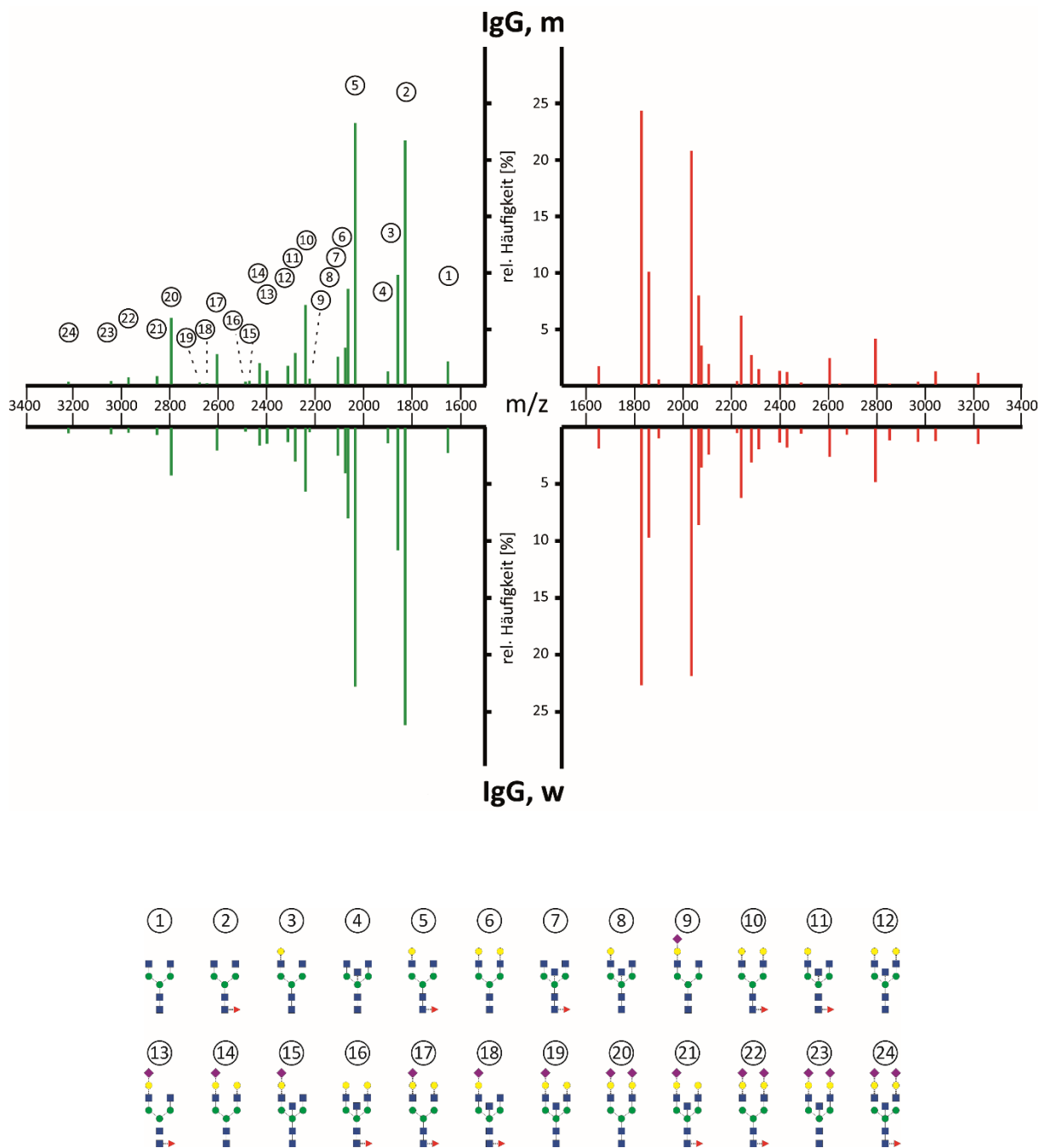
⑪		FA2BG1	0,063	0,029	0,111	0,686
⑫		A2BG2	0,024	0,066	0,677	n.a.
⑬		FA2G1S1	0,016	< 0,001	0,413	n.a.
⑭		A2G2S1	0,413	0,105	0,940	0,686
⑮		A2BG1S1	n.a.	0,686	0,556	n.a.
⑯		FA2BG2	0,104	0,286	0,924	0,591
⑰		FA2G2S1	0,227	0,228	0,239	0,448
⑱		FA2BG1S1	0,043	0,145	n.a.	0,784
⑲		A2BG2S1	0,190	0,166	n.a.	0,767
⑳		A2G2S2	0,033	0,001	n.a.	0,318
㉑		FA2BG2S1	0,001	0,007	n.a.	0,857
㉒		FA2G2S2	< 0,001	0,001	n.a.	0,859
㉓		A2BG2S2	0,140	0,686	n.a.	0,486
㉔		FA2BG2S2	0,001	0,001	n.a.	0,510
		<b>F0</b>	0,011	0,060	0,861	0,918
		<b>F1</b>	0,011	0,060	0,861	0,918
		<b>B0</b>	< 0,001	< 0,001	0,741	0,014
		<b>B1</b>	< 0,001	< 0,001	0,741	0,014
		<b>G0</b>	< 0,001	0,005	0,089	0,150

---

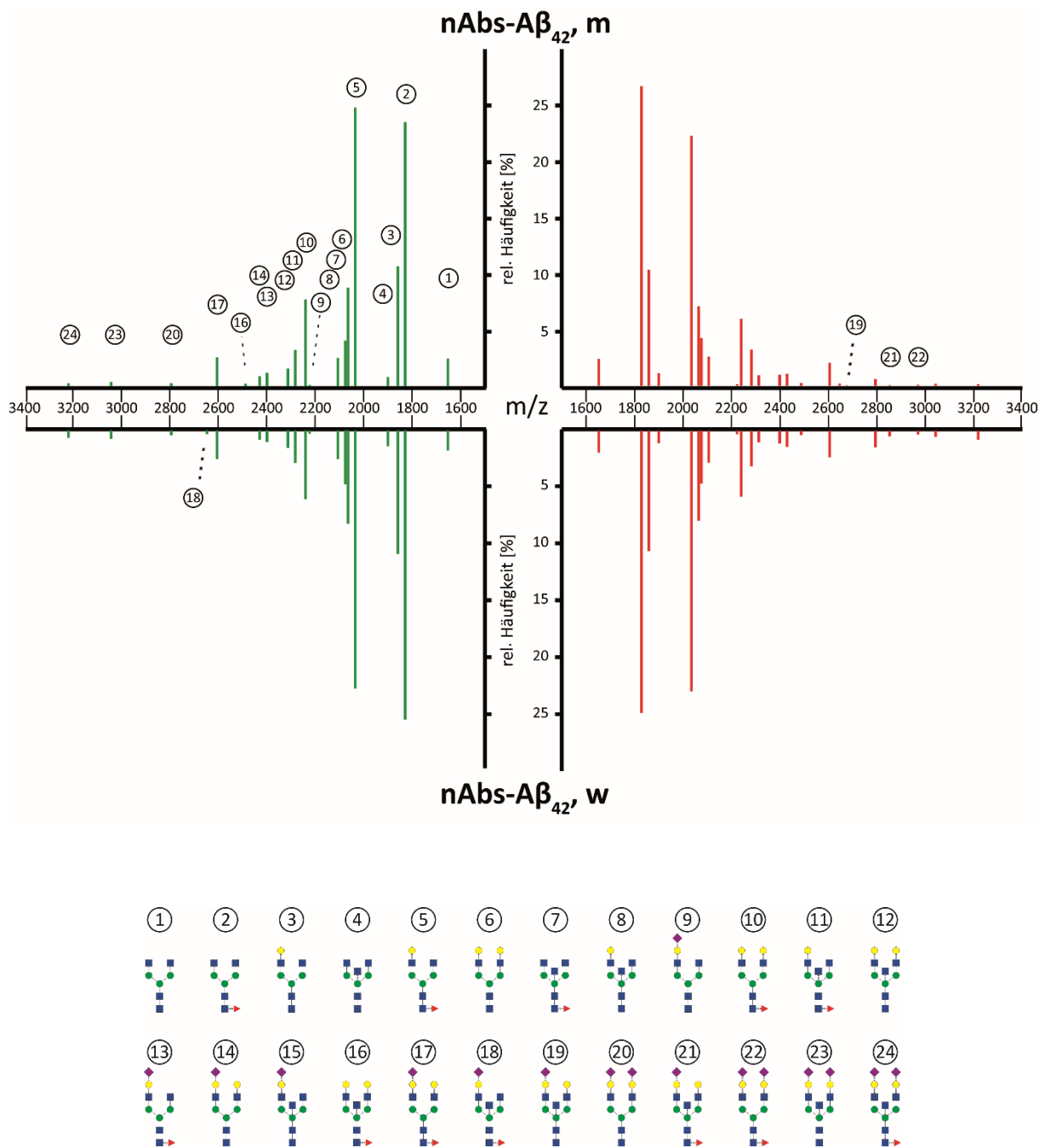
<b>G1</b>	< 0,001	0,004	0,407	0,272
<b>G2</b>	< 0,001	0,001	0,020	0,137
<b>S0</b>	< 0,001	< 0,001	0,402	0,159
<b>S1</b>	< 0,001	< 0,001	0,402	0,005
<b>S2</b>	< 0,001	0,003	n.a.	0,925

---

## 7.1.2 Geschlechtsbezogene Auswertung der Patientenstudie



**Abbildung A1. Geschlechtsbezogene Fc N-Glykosylierungsmuster von IgG bei der Alzheimer-Krankheit.** Mittlere Massenspektren der Fc-assoziierten Glykane von IgG aus männlichen und weiblichen Kontrollprobanden (**grün**) sowie Alzheimer-Patienten (**rot**). Jeder Peak repräsentiert einen Glykan bestimmter Zusammensetzung und konnte über die spezifische Masse (m)/Ladung (z) (X-Achse) als Messgröße der MALDI-TOF-basierten Massenspektrometrie ermittelt werden. Die Peakintensitäten wurden auf die jeweilige Gesamtintensität normiert, um die relative Häufigkeit der einzelnen Glykane (Y-Achse) darstellen zu können. Die Zusammensetzungen aller 24 möglichen Glykane sind in der Legende dargestellt: blaues Quadrat = N-Acetylglucosamin, rotes Dreieck = Fucose, grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Galaktose, violette Raute = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure.



**Abbildung A2. Geschlechtsbezogene Fc N-Glykosylierungsmuster von nAbs-Aβ<sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Mittlere Massenspektren der Fc-assoziierten Glykane von nAbs-Aβ<sub>42</sub> aus männlichen und weiblichen Kontrollprobanden (grün) sowie Alzheimer-Patienten (rot). Jeder Peak repräsentiert einen Glykan bestimmter Zusammensetzung und konnte über die spezifische Masse (m)/Ladung (z) (X-Achse) als Messgröße der MALDI-TOF-basierten Massenspektrometrie ermittelt werden. Die Peakintensitäten wurden auf die jeweilige Gesamtintensität normiert, um die relative Häufigkeit der einzelnen Glykane (Y-Achse) darstellen zu können. Die Zusammensetzungen aller 24 möglichen Glykane sind in der Legende dargestellt: blaues Quadrat = N-Acetylglucosamin, rotes Dreieck = Fucose, grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Galaktose, violette Raute = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure.



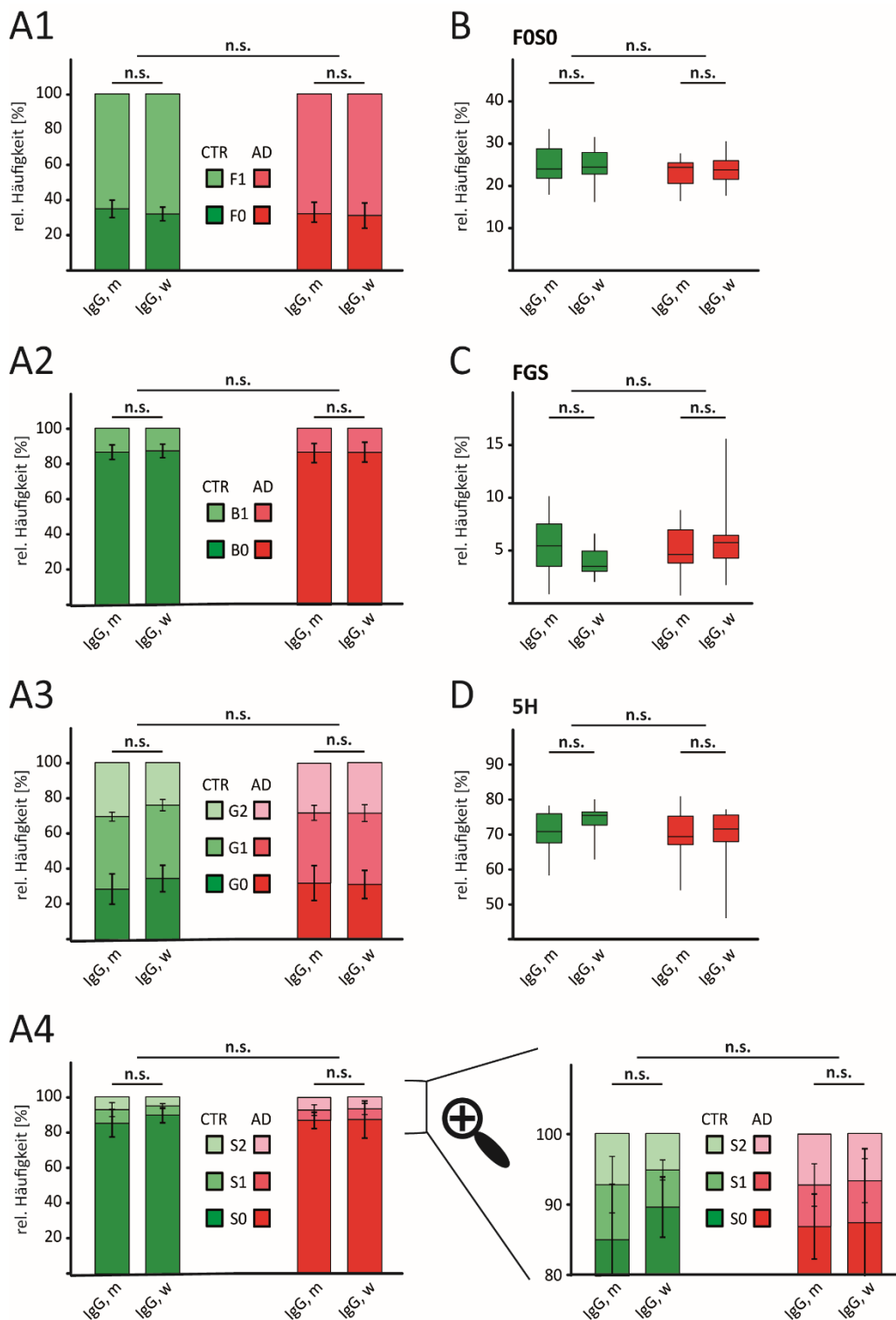
**Tabelle A2. Geschlechtsbezogene relative Häufigkeiten der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die Nummerierung, die schematische Struktur (blaues Quadrat = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), rotes Dreieck = Fucose (Fuc), grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Galaktose (Gal), violette Raute = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)), die IUPAC Nomenklatur (F = Fuc, A = GlcNAc, B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Gal, S = Neu5Ac) sowie die relativen Häufigkeiten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der Fc-assoziierten Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aus männlichen und weiblichen Kontrollprobanden (CTR) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (AD).

Struktur	IUPAC	rel. Häufigkeit [%]							
		CTR, m		CTR, w		AD, m		AD, w	
		IgG	nAbs	IgG	nAbs	IgG	nAbs	IgG	nAbs
①	A2G0	2,0 $\pm$ 1,5	2,5 $\pm$ 1,2	2,0 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 1,5	1,6 $\pm$ 1,5	2,4 $\pm$ 1,6	1,6 $\pm$ 1,6	1,7 $\pm$ 1,4
②	FA2G0	21,4 $\pm$ 6,2	23,4 $\pm$ 4,3	26,1 $\pm$ 5,1	25,4 $\pm$ 6,3	24,0 $\pm$ 7,9	26,6 $\pm$ 8,1	22,5 $\pm$ 8,4	24,8 $\pm$ 5,0
③	A2G1	9,6 $\pm$ 2,7	10,6 $\pm$ 3,0	10,7 $\pm$ 1,7	10,7 $\pm$ 2,4	9,9 $\pm$ 2,5	10,3 $\pm$ 2,3	9,5 $\pm$ 2,6	10,4 $\pm$ 1,8
④	A2BG0	1,1 $\pm$ 0,8	0,8 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 1,2	0,5 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 1,2	0,7 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 1,1
⑤	FA2G1	22,9 $\pm$ 3,9	24,7 $\pm$ 4,5	22,7 $\pm$ 4,1	22,6 $\pm$ 3,8	20,5 $\pm$ 4,6	22,2 $\pm$ 3,2	21,7 $\pm$ 3,9	22,9 $\pm$ 5,9
⑥	A2G2	8,4 $\pm$ 1,3	8,7 $\pm$ 2,1	7,8 $\pm$ 1,9	8,0 $\pm$ 1,2	7,8 $\pm$ 1,9	7,0 $\pm$ 1,6	8,3 $\pm$ 1,4	7,7 $\pm$ 1,8
⑦	FA2BG0	3,2 $\pm$ 0,9	4,1 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 2,0	4,5 $\pm$ 1,1	3,4 $\pm$ 1,0	4,2 $\pm$ 1,9	3,2 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 1,3
⑧	A2BG1	2,4 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 1,4	1,8 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 0,8	2,6 $\pm$ 0,6
⑨	A2G1S1	0,5 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,2
⑩	FA2G2	7,0 $\pm$ 2,1	7,7 $\pm$ 2,7	5,4 $\pm$ 1,6	5,9 $\pm$ 2,3	6,1 $\pm$ 4,1	5,9 $\pm$ 2,5	5,9 $\pm$ 1,7	5,6 $\pm$ 1,8
⑪	FA2BG1	2,7 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 1,1	2,6 $\pm$ 1,2	3,2 $\pm$ 0,7	2,8 $\pm$ 0,8	2,9 $\pm$ 0,4
⑫	A2BG2	1,6 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 1,0	0,9 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,7
⑬	FA2G1S1	1,2 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 1,3	1,0 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 1,0
⑭	A2G2S1	1,9 $\pm$ 0,6	0,9 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 1,1
⑮	A2BG1S1	0,3 $\pm$ 0,4	0	0	0	0	0	0	0
⑯	FA2BG2	0,2 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,3	0	0,2 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,4
⑰	FA2G2S1	2,7 $\pm$ 1,4	2,6 $\pm$ 1,3	1,8 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 1,3	2,3 $\pm$ 1,6	2,0 $\pm$ 1,5	2,3 $\pm$ 1,5	2,1 $\pm$ 1,4
⑱	FA2BG1S1	0,1 $\pm$ 0,3	0	0	0,1 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,4	0	0

⑲		A2BG2S1	$0,2 \pm 0,3$	0	0	0	0	$0,1 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,8$	0
⑳		A2G2S2	$5,8 \pm 3,8$	$0,3 \pm 0,6$	$4,0 \pm 2,1$	$0,2 \pm 0,5$	$4,1 \pm 1,8$	$0,6 \pm 1,0$	$4,5 \pm 3,3$	$1,3 \pm 1,6$
㉑		FA2BG2S1	$0,7 \pm 0,5$	0	$0,4 \pm 0,5$	0	$0,1 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,9$	$0,3 \pm 0,6$
㉒		FA2G2S2	$0,6 \pm 0,5$	0	$0,2 \pm 0,4$	0	$0,3 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,2$	$1,0 \pm 1,0$	$0,1 \pm 0,2$
㉓		A2BG2S2	$0,3 \pm 0,5$	$0,4 \pm 1,0$	$0,4 \pm 0,6$	$0,5 \pm 1,5$	$1,2 \pm 2,2$	$0,2 \pm 0,5$	$0,9 \pm 2,0$	$0,3 \pm 0,8$
㉔		FA2BG2S2	$0,2 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,8$	$0,3 \pm 0,5$	$0,4 \pm 1,2$	$1,1 \pm 1,7$	$0,1 \pm 0,4$	$1,2 \pm 1,7$	$0,6 \pm 1,5$

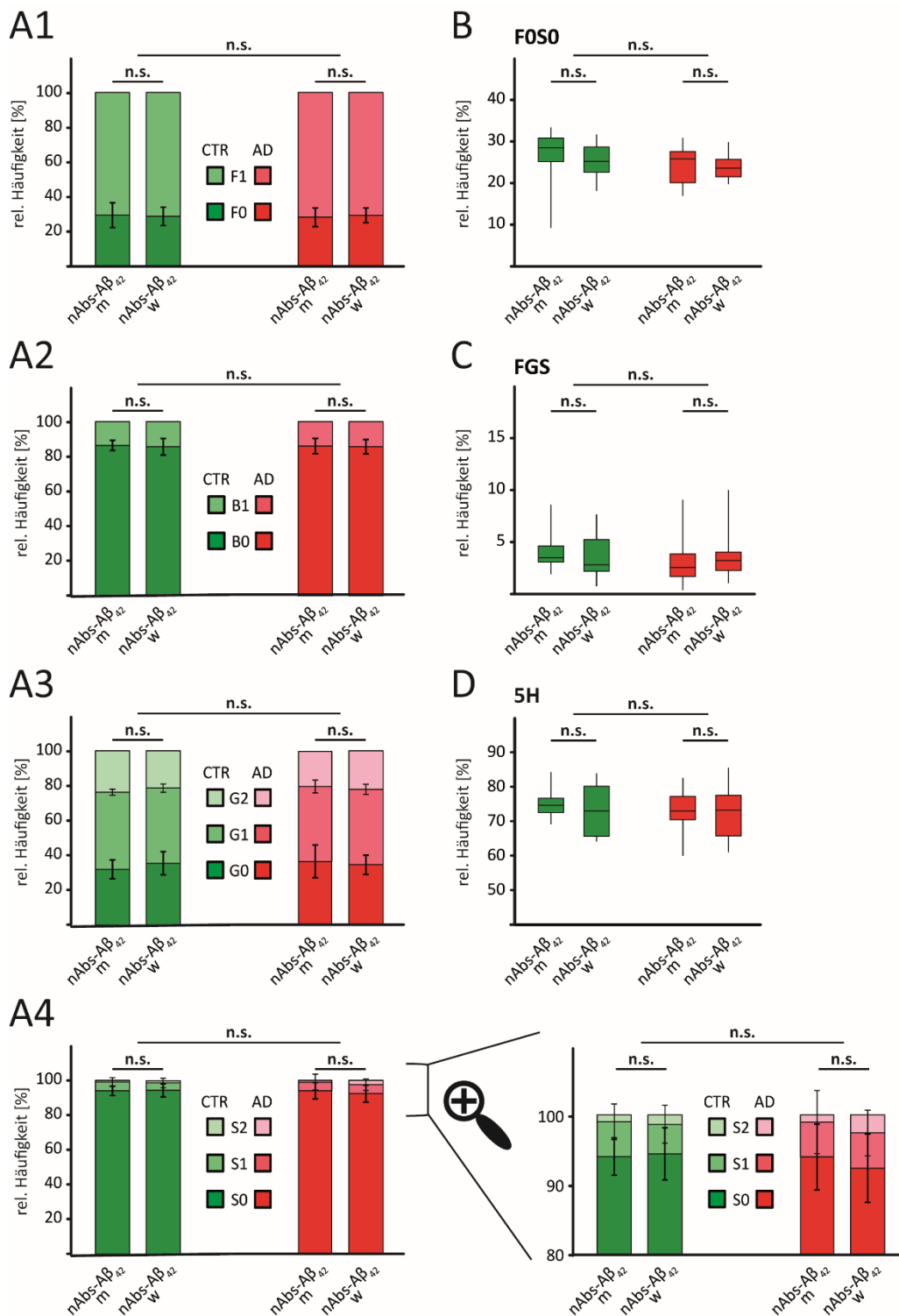
**Tabelle A3. Geschlechtsbezogener statistischer Vergleich der Fc N-Glykosylierung von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die p-Werte signifikanter Unterschiede nach Anwendung statistischer Tests zur Überprüfung unterschiedlicher relativer Häufigkeiten einzelner Glykane zwischen männlichen und weiblichen Kontrollprobanden (CTR) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (AD). Die Oligosaccharide wurden mithilfe ihrer Nummerierung sowie der IUPAC Nomenklatur gekennzeichnet: F = Fucose, A = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Galaktose, S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure.

	CTR, m IgG		AD, m nAbs		CTR, w nAbs		AD, w IgG	
	Glykan	p-Wert	Glykan	p-Wert	Glykan	p-Wert	Glykan	p-Wert
CTR m nAbs	⑪ FA2BG1	* 0,039	-	-	⑩ FA2BG2	* 0,031		
	⑭ A2G2S1	* 0,029	-	-				
	⑳ A2G2S2	** 0,005	-	-				
	㉑ FA2BG2S1	* 0,012						
	㉒ FA2G2S2	* 0,026						
AD m IgG	⑭ A2G2S1	* 0,034	㉒ A2G2S2	** 0,005			㉑ FA2BG2S1	* 0,027
	⑮ A2BG1S1	* 0,031					㉒ FA2G2S2	* 0,026
	㉑ FA2BG2S1	** 0,006						
CTR w IgG	⑮ A2BG1S1	* 0,031			⑭ A2G2S1	* 0,022		
					㉒ A2G2S2	** 0,005	㉒ FA2G2S2	* 0,014
					㉑ FA2BG2S1	* 0,043		
AD w nAbs			-	-	-	-	⑦ FA2BG0	** 0,007
							⑫ A2BG2	** 0,002
							㉒ A2G2S2	** 0,009
							㉒ FA2G2S2	* 0,015



**Abbildung A3. Geschlechtsbezogener Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG bei der Alzheimer-Krankheit.**

Hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur enthaltenen Zuckermoleküle wurden Fc N-Glykane von IgG aus männlichen und weiblichen Kontrollprobanden (grün) sowie Alzheimer-Patienten (rot) zusammengefasst. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von Oligosacchariden mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc, **A1**), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc, **A2**), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal, **A3**) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, **A4**). Darüber hinaus wurde der Anteil an Glykanen ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0, **B**), mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS, **C**) bzw. der Anteil der fünf häufigsten Glykane (5H, **D**) analysiert und verglichen.



**Abbildung A4. Geschlechtsbezogener Zusammenschluss der Fc N-Glykane von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur enthaltenen Zuckermoleküle wurden Fc N-Glykane von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aus männlichen und weiblichen Kontrollprobanden (grün) sowie Alzheimer-Patienten (rot) zusammengefasst. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von Oligosacchariden mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc, **A1**), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc, **A2**), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal, **A3**) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, **A4**). Darüber hinaus wurde der Anteil an Glykanen ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0, **B**), mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS, **C**) bzw. der Anteil der fünf häufigsten Glykane (5H, **D**) analysiert und verglichen.

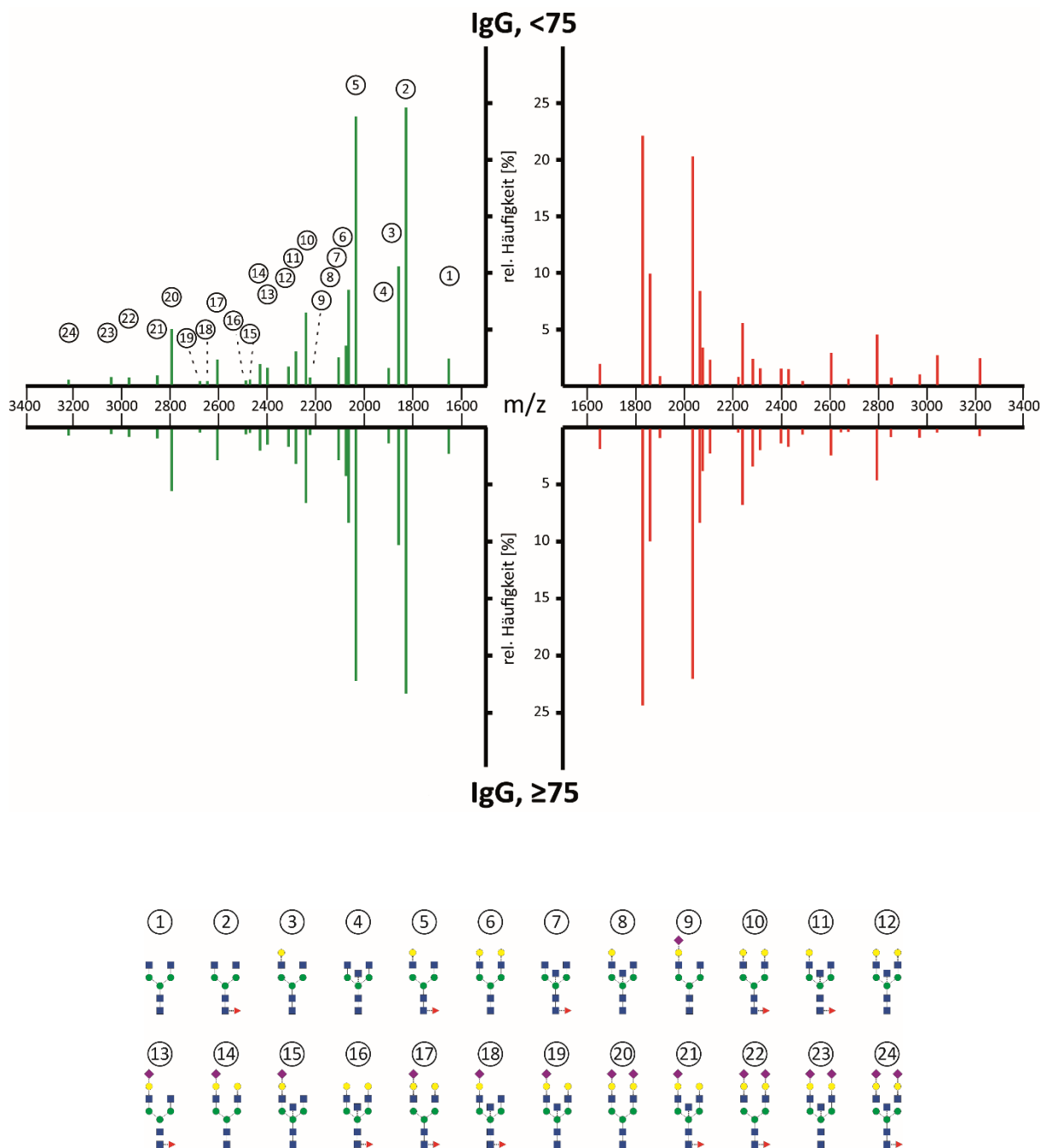
**Tabelle A4. Geschlechtsbezogene relative Häufigkeiten nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der Fc-assoziierten Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aus männlichen und weiblichen Kontrollprobanden (**CTR**) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (**AD**), nachdem Oligosaccharide mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zusammengefasst wurden. Darüber hinaus sind die relativen Häufigkeiten von Glykanen ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0), mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS) und der fünf häufigsten Glykane (5H) dargestellt.

rel. Häufigkeit [%]								
	CTR, m		CTR, w		AD, m		AD, w	
	IgG	nAbs	IgG	nAbs	IgG	nAbs	IgG	nAbs
<b>F0</b>	35,1 $\pm$ 4,9	29,6 $\pm$ 7,1	32,2 $\pm$ 3,9	29,0 $\pm$ 5,3	32,4 $\pm$ 4,5	28,5 $\pm$ 5,4	31,4 $\pm$ 7,1	29,6 $\pm$ 4,3
<b>F1</b>	64,9 $\pm$ 4,9	70,4 $\pm$ 7,1	67,8 $\pm$ 3,9	71,0 $\pm$ 5,3	67,6 $\pm$ 4,5	71,5 $\pm$ 5,4	68,7 $\pm$ 7,3	70,4 $\pm$ 4,3
<b>B0</b>	86,5 $\pm$ 4,1	86,4 $\pm$ 2,9	87,2 $\pm$ 3,8	85,6 $\pm$ 4,7	86,5 $\pm$ 4,4	86,1 $\pm$ 4,4	86,6 $\pm$ 5,6	85,7 $\pm$ 4,1
<b>B1</b>	13,5 $\pm$ 4,1	13,6 $\pm$ 2,9	12,8 $\pm$ 3,8	14,4 $\pm$ 4,7	13,5 $\pm$ 4,4	13,9 $\pm$ 4,4	13,6 $\pm$ 5,5	14,3 $\pm$ 4,1
<b>G0</b>	28,6 $\pm$ 8,6	32,0 $\pm$ 5,4	34,6 $\pm$ 7,5	35,5 $\pm$ 6,6	32,1 $\pm$ 9,9	36,7 $\pm$ 9,5	31,2 $\pm$ 8,0	34,6 $\pm$ 5,5
<b>G1</b>	41,0 $\pm$ 2,5	44,3 $\pm$ 1,7	41,5 $\pm$ 3,2	43,1 $\pm$ 2,3	39,8 $\pm$ 3,3	43,1 $\pm$ 3,7	40,3 $\pm$ 4,8	43,3 $\pm$ 2,9
<b>G2</b>	30,4 $\pm$ 8,8	23,7 $\pm$ 4,4	24,0 $\pm$ 5,8	21,4 $\pm$ 5,7	28,2 $\pm$ 8,7	20,2 $\pm$ 6,8	28,6 $\pm$ 10,7	22,1 $\pm$ 4,3
<b>S0</b>	85,1 $\pm$ 7,7	94,0 $\pm$ 2,7	89,6 $\pm$ 4,2	94,4 $\pm$ 3,7	86,9 $\pm$ 5,1	93,9 $\pm$ 4,7	87,4 $\pm$ 10,6	92,3 $\pm$ 4,9
<b>S1</b>	7,7 $\pm$ 4,0	5,0 $\pm$ 2,6	5,2 $\pm$ 1,4	4,3 $\pm$ 2,7	5,9 $\pm$ 3,3	5,0 $\pm$ 4,5	6,0 $\pm$ 3,1	5,1 $\pm$ 3,3
<b>S2</b>	7,2 $\pm$ 4,2	1,0 $\pm$ 1,9	5,1 $\pm$ 3,0	1,4 $\pm$ 3,1	7,2 $\pm$ 4,3	1,0 $\pm$ 1,4	6,7 $\pm$ 7,5	2,6 $\pm$ 2,7
<b>F0S0</b>	25,2 $\pm$ 4,8	26,7 $\pm$ 6,6	25,0 $\pm$ 4,3	25,2 $\pm$ 4,7	23,1 $\pm$ 3,9	24,3 $\pm$ 4,8	23,8 $\pm$ 3,9	24,2 $\pm$ 3,5
<b>FGS</b>	5,5 $\pm$ 2,9	4,1 $\pm$ 1,8	3,9 $\pm$ 1,4	3,7 $\pm$ 2,2	5,1 $\pm$ 2,6	3,5 $\pm$ 2,9	6,3 $\pm$ 4,1	4,0 $\pm$ 3,0
<b>5H</b>	70,7 $\pm$ 5,9	75,5 $\pm$ 4,5	73,7 $\pm$ 5,0	73,3 $\pm$ 8,2	69,6 $\pm$ 7,8	72,6 $\pm$ 6,7	69,2 $\pm$ 9,4	72,1 $\pm$ 8,1

**Tabelle A5. Geschlechtsbezogener statistischer Vergleich nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-Aß<sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.**  
Dargestellt sind die *p*-Werte signifikanter Unterschiede nach Anwendung statistischer Tests zur Überprüfung unterschiedlicher relativer Häufigkeiten der Glykane zwischen männlichen und weiblichen Kontrollprobanden (CTR) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (AD), nachdem Oligosaccharide mit (F1) oder ohne (F0) Fucose, mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuramin-säure zusammengefasst wurden.

	CTR, m IgG		AD, m nAbs		CTR, w nAbs		AD, w IgG	
	Zuckerreste	<i>p</i> -Wert	Zuckerreste	<i>p</i> -Wert	Zuckerreste	<i>p</i> -Wert	Zuckerreste	<i>p</i> -Wert
CTR m nAbs	F0 F1 G1 S0 S2	* 0,047 ** 0,047 ** 0,004 * 0,013 ** 0,009	-	-	-	-		
AD m IgG	A2BG0	* 0,049	F0 G2 S0 S2	* 0,020 * 0,022 * 0,011 ** 0,005			-	-
CTR w IgG	-	-			S0 S2	* 0,017 ** 0,005	-	-
AD w nAbs			-	-	-	-	G2	* 0,037

## 7.1.3 Altersbezogene Auswertung der Patientenstudie









**Abbildung A5. Altersbezogene Fc N-Glykosylierungsmuster von IgG bei der Alzheimer-Krankheit.** Mittlere Massenspektren der Fc-assoziierten Glykane von IgG aus unter und über 75-jährigen Kontrollprobanden (grün) sowie Alzheimer-Patienten (rot). Jeder Peak repräsentiert einen Glykan bestimmter Zusammensetzung und konnte über die spezifische Masse ( $m$ )/Ladung ( $z$ ) (X-Achse) als Messgröße der MALDI-TOF-basierten Massenspektrometrie ermittelt werden. Die Peakintensitäten wurden auf die jeweilige Gesamtintensität normiert, um die relative Häufigkeit der einzelnen Glykane (Y-Achse) darstellen zu können. Die Zusammensetzungen aller 24 möglichen Glykane sind in der Legende dargestellt: blaues Quadrat = N-Acetylglucosamin, rotes Dreieck = Fucose, grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Galaktose, violette Raute = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure.



Seite | 175

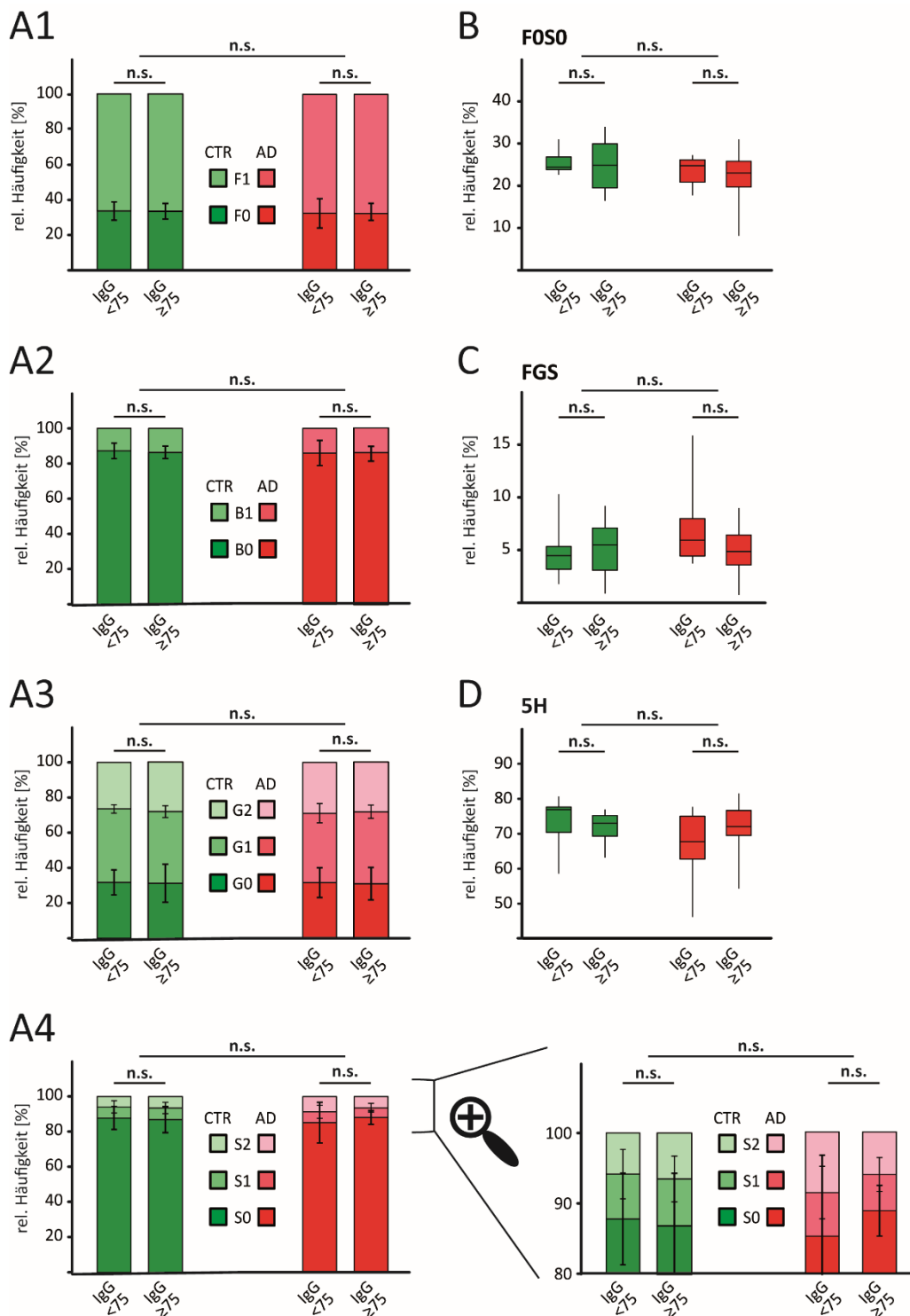
**Tabelle A6. Altersbezogene relative Häufigkeiten der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die Nummerierung, die schematische Struktur (blaues Quadrat = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), rotes Dreieck = Fucose (Fuc), grüner Kreis = Mannose, gelber Kreis = Galaktose (Gal), violette Raute = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)), die IUPAC Nomenklatur (F = Fuc, A = GlcNAc, B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Gal, S = Neu5Ac) sowie die relativen Häufigkeiten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der Fc-assoziierten Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aus unter und über 75-jährigen Kontrollprobanden (CTR) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (AD).

Struktur	IUPAC	rel. Häufigkeit [%]							
		CTR, <75		CTR, $\geq 75$		AD, <75		AD, $\geq 75$	
		IgG	nAbs	IgG	nAbs	IgG	nAbs	IgG	nAbs
①	A2G0	2,1 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 1,8	2,0 $\pm$ 1,3	1,7 $\pm$ 1,6	1,6 $\pm$ 1,1	1,6 $\pm$ 1,5	2,4 $\pm$ 1,8
②	FA2G0	24,3 $\pm$ 6,1	24,8 $\pm$ 4,5	23,2 $\pm$ 6,7	23,8 $\pm$ 6,7	21,8 $\pm$ 9,1	23,6 $\pm$ 6,5	24,2 $\pm$ 7,5	27,0 $\pm$ 6,7
③	A2G1	10,2 $\pm$ 2,0	10,6 $\pm$ 2,6	10,0 $\pm$ 2,9	10,8 $\pm$ 2,9	9,6 $\pm$ 2,3	10,1 $\pm$ 2,6	9,7 $\pm$ 2,7	10,6 $\pm$ 1,7
④	A2BG0	1,2 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 1,0	0,8 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 0,7	0,8 $\pm$ 1,1
⑤	FA2G1	23,5 $\pm$ 4,1	24,5 $\pm$ 4,9	22,0 $\pm$ 3,9	22,7 $\pm$ 3,4	20,0 $\pm$ 4,0	23,0 $\pm$ 5,6	21,9 $\pm$ 4,4	22,2 $\pm$ 3,7
⑥	A2G2	8,2 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 2,1	8,0 $\pm$ 2,2	8,5 $\pm$ 1,4	8,1 $\pm$ 1,8	8,2 $\pm$ 1,5	8,1 $\pm$ 1,7	6,9 $\pm$ 1,4
⑦	FA2BG0	3,2 $\pm$ 1,0	3,9 $\pm$ 0,8	3,9 $\pm$ 2,0	4,8 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 1,5	3,5 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 1,3
⑧	A2BG1	2,2 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 1,2	2,5 $\pm$ 0,7	2,6 $\pm$ 1,1	2,0 $\pm$ 0,9	2,5 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,9	2,6 $\pm$ 0,5
⑨	A2G1S1	0,4 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,9	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,2
⑩	FA2G2	6,1 $\pm$ 1,8	7,1 $\pm$ 3,0	6,3 $\pm$ 2,5	6,4 $\pm$ 2,2	5,2 $\pm$ 1,5	6,7 $\pm$ 2,0	6,5 $\pm$ 3,9	5,2 $\pm$ 2,1
⑪	FA2BG1	2,7 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 1,2	2,8 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 1,0	2,9 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,8	3,2 $\pm$ 0,7
⑫	A2BG2	1,4 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,9	1,3 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,7
⑬	FA2G1S1	1,3 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 1,4	1,1 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,5
⑭	A2G2S1	1,6 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 1,1
⑮	A2BG1S1	0,2 $\pm$ 0,4	0	0,1 $\pm$ 0,3	0	0	0	0	0
⑯	FA2BG2	0,2 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,3
⑰	FA2G2S1	2,0 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 1,5	2,9 $\pm$ 1,6	2,6 $\pm$ 1,4	3,1 $\pm$ 1,8	2,1 $\pm$ 1,6	1,4 $\pm$ 0,5
⑱	FA2BG1S1	0,1 $\pm$ 0,3	0	0	0,1 $\pm$ 0,4	0	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,3

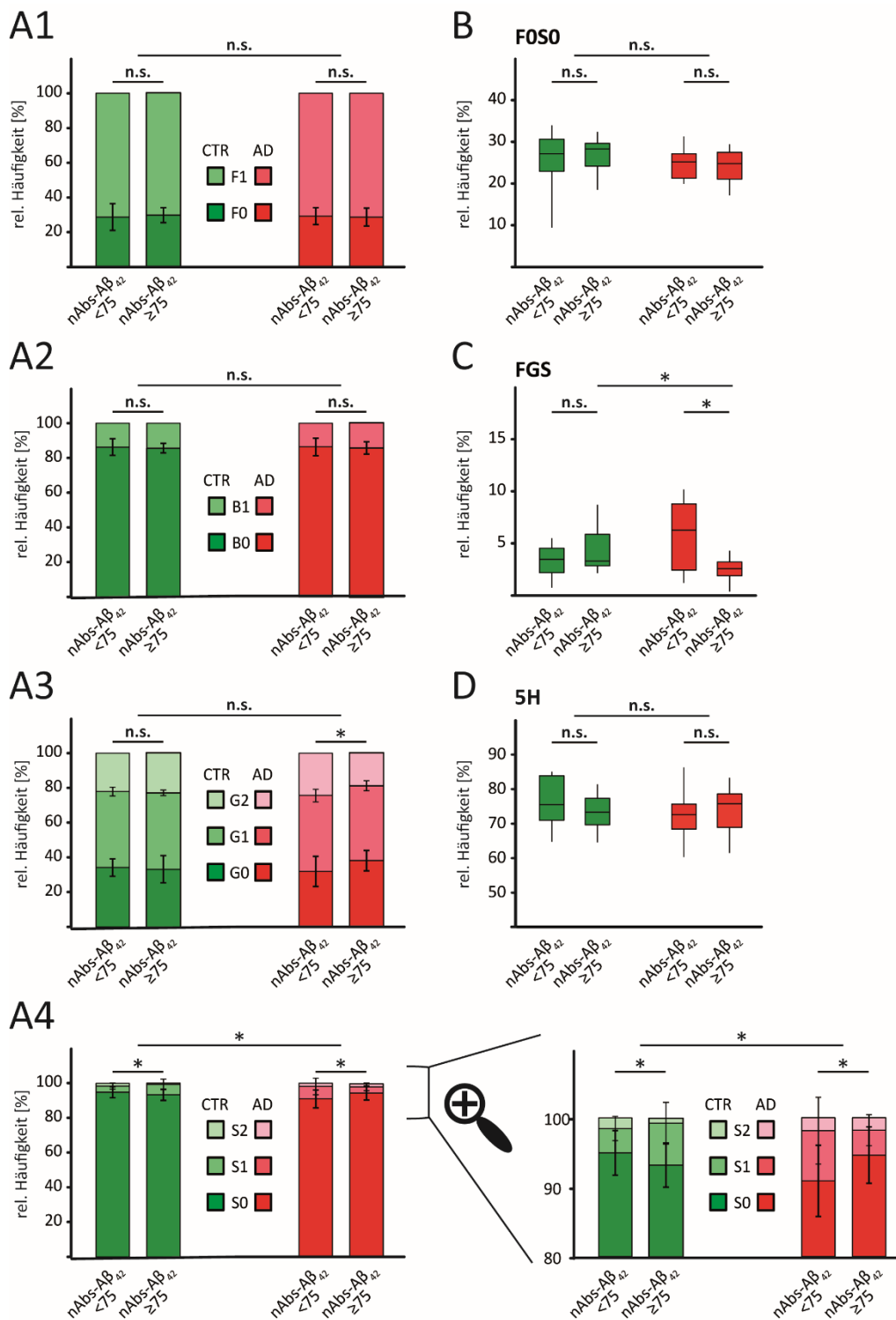
⑲		A2BG2S1	$0,1 \pm 0,3$	0	$0,1 \pm 0,2$	0	$0,3 \pm 0,9$	$0,1 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,2$	0
⑳		A2G2S2	$4,7 \pm 2,8$	$0,1 \pm 0,2$	$5,2 \pm 3,9$	$0,5 \pm 0,8$	$4,2 \pm 3,5$	$0,6 \pm 0,7$	$4,3 \pm 2,0$	$1,1 \pm 1,7$
㉑		FA2BG2S1	$0,6 \pm 0,6$	0	$0,6 \pm 0,5$	0	$0,4 \pm 0,9$	$0,1 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,6$
㉒		FA2G2S2	$0,4 \pm 0,5$	0	$0,4 \pm 0,5$	0	$0,7 \pm 1,2$	$0,1 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,2$
㉓		A2BG2S2	$0,4 \pm 0,6$	$0,7 \pm 1,6$	$0,2 \pm 0,6$	$0,1 \pm 0,3$	$2,4 \pm 2,7$	$0,3 \pm 0,8$	$0,1 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,5$
㉔		FA2BG2S2	$0,2 \pm 0,3$	$0,6 \pm 1,3$	$0,3 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,2$	$2,2 \pm 2,2$	$0,6 \pm 1,7$	$0,4 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,5$

**Tabelle A7. Altersbezogener statistischer Vergleich der Fc N-Glykosylierung von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die *p*-Werte signifikanter Unterschiede nach Anwendung statistischer Tests zur Überprüfung unterschiedlicher relativer Häufigkeiten einzelner Glykane zwischen unter und über 75-jährigen Kontrollprobanden (**CTR**) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (**AD**). Die Oligosaccharide wurden mithilfe ihrer Nummerierung sowie der IUPAC Nomenklatur gekennzeichnet: F = Fucose, A = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Galaktose, S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure.

	<b>CTR, &lt;75</b> IgG		<b>AD, &lt;75</b> nAbs		<b>CTR, ≥75</b> nAbs		<b>AD, ≥75</b> IgG	
	Glykan	<i>p</i> -Wert	Glykan	<i>p</i> -Wert	Glykan	<i>p</i> -Wert	Glykan	<i>p</i> -Wert
<b>CTR</b> <b>&lt;75</b> <b>nAbs</b>	⑬ FA2G1S1	* 0,033						
	⑭ A2G2S1	** 0,006	⑭ A2G2S1	* 0,014				
	⑳ A2G2S2	*** 0,003	㉑ A2G2S2	* 0,012				
	㉑ FA2BG2S1	* 0,018						
	㉒ FA2G2S2	* 0,042						
<b>AD</b> <b>&lt;75</b> <b>IgG</b>	-	-	㉑ A2G2S2	* 0,012			⑪ FA2BG1	* 0,023
							㉓ A2BG2S2	** 0,009
<b>CTR</b> <b>≥75</b> <b>IgG</b>	-	-			⑫ A2BG2	* 0,035		
					㉑ A2G2S2	** 0,008		
					㉑ FA2BG2S1	* 0,027		
<b>AD</b> <b>≥75</b> <b>nAbs</b>			⑦ FA2BG0	* 0,045			② FA2G0	* 0,036
			⑬ FA2G1S1	* 0,019			⑦ FA2BG0	** 0,004
			⑰ FA2G2S1	** 0,006			⑧ A2BG1	* 0,041
					⑥ A2G2	* 0,025	⑩ FA2G2	* 0,041
					⑫ A2BG2	** 0,002	⑫ A2BG2	* 0,012
					⑬ FA2G1S1	** 0,005	⑬ FA2G1S1	* 0,017
					⑰ FA2G2S1	** 0,006	② A2G2S2	** 0,003
							㉑ FA2G2S2	* 0,038



**Abbildung A7. Altersbezogener Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG bei der Alzheimer-Krankheit.** Hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur enthaltenen Zuckermoleküle wurden Fc N-Glykane von IgG aus unter und über 75-jährigen Kontrollprobanden (grün) sowie Alzheimer-Patienten (rot) zusammengefasst. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von Oligosacchariden mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc, **A1**), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc, **A2**), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal, **A3**) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, **A4**). Darüber hinaus wurde der Anteil an Glykanen ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0, **B**), mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS, **C**) bzw. der Anteil der fünf häufigsten Glykane (5H, **D**) analysiert und verglichen.



**Abbildung A8. Altersbezogener Zusammenschluss der Fc N-Glykane von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Hinsichtlich ihrer zusätzlich zur Kernstruktur enthaltenen Zuckermoleküle wurden Fc N-Glykane von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aus unter und über 75-jährigen Kontrollprobanden (grün) sowie Alzheimer-Patienten (rot) zusammengefasst. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von Oligosacchariden mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc, **A1**), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc, **A2**), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal, **A3**) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, **A4**). Darüber hinaus wurde der Anteil an Glykanen ohne Fuc und Neu5Ac (FOS0, **B**), mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS, **C**) bzw. der Anteil der fünf häufigsten Glykane (5H, **D**) analysiert und verglichen.

**Tabelle A8. Altersbezogene relative Häufigkeiten nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) der Fc-assoziierten Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> aus unter und über 75-Jährigen Kontrollprobanden (CTR) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (AD), nachdem Oligosaccharide mit (F1) oder ohne (F0) Fucose (Fuc), mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin (b-GlcNAc), mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose (Gal) sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zusammengefasst wurden. Darüber hinaus sind die relativen Häufigkeiten von Glykanen ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0), mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS) und der fünf häufigsten Glykane (5H) dargestellt.

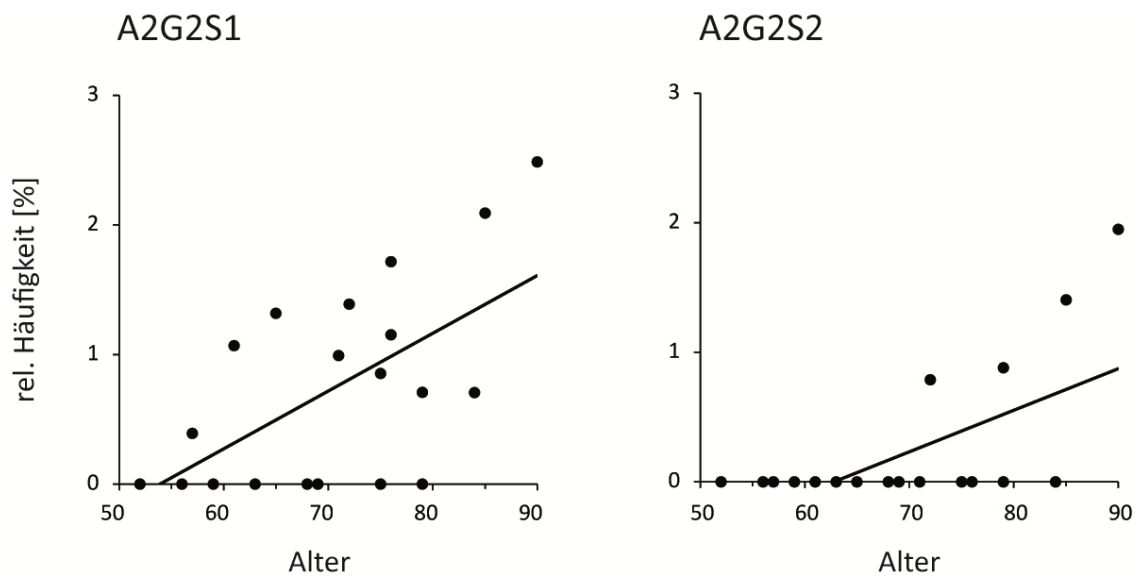
rel. Häufigkeit [%]								
	CTR, <75		CTR, $\geq$ 75		AD, <75		AD, $\geq$ 75	
	IgG	nAbs	IgG	nAbs	IgG	nAbs	IgG	nAbs
F0	33,6 $\pm$ 5,2	28,8 $\pm$ 7,7	33,7 $\pm$ 4,4	30,0 $\pm$ 4,3	32,5 $\pm$ 8,2	29,4 $\pm$ 4,8	32,8 $\pm$ 5,9	28,8 $\pm$ 5,1
F1	66,4 $\pm$ 5,2	71,2 $\pm$ 7,7	66,3 $\pm$ 4,4	70,0 $\pm$ 4,3	67,6 $\pm$ 8,5	70,6 $\pm$ 4,8	68,8 $\pm$ 3,9	71,2 $\pm$ 5,1
B0	87,2 $\pm$ 4,4	86,2 $\pm$ 4,8	86,4 $\pm$ 3,5	85,7 $\pm$ 2,7	86,0 $\pm$ 7,3	86,3 $\pm$ 5,0	87,4 $\pm$ 3,6	85,5 $\pm$ 3,5
B1	12,8 $\pm$ 4,4	13,8 $\pm$ 4,8	13,6 $\pm$ 3,5	14,3 $\pm$ 2,7	14,1 $\pm$ 7,1	13,7 $\pm$ 5,0	14,3 $\pm$ 4,9	14,5 $\pm$ 3,5
G0	31,7 $\pm$ 7,1	34,2 $\pm$ 5,0	31,4 $\pm$ 10,7	33,3 $\pm$ 7,8	31,7 $\pm$ 8,5	31,9 $\pm$ 8,7	31,6 $\pm$ 9,3	38,2 $\pm$ 5,8
G1	41,8 $\pm$ 2,4	43,7 $\pm$ 2,5	40,5 $\pm$ 3,3	43,7 $\pm$ 1,6	39,5 $\pm$ 5,5	43,7 $\pm$ 3,6	41,4 $\pm$ 3,8	42,9 $\pm$ 2,8
G2	26,5 $\pm$ 6,8	22,2 $\pm$ 4,1	28,1 $\pm$ 10,1	23,0 $\pm$ 6,6	28,9 $\pm$ 11,8	24,4 $\pm$ 6,3	28,6 $\pm$ 9,5	19,0 $\pm$ 4,2
S0	87,8 $\pm$ 6,5	95,0 $\pm$ 3,2	86,9 $\pm$ 7,4	93,2 $\pm$ 3,2	85,3 $\pm$ 11,6	90,9 $\pm$ 5,1	89,5 $\pm$ 3,9	94,6 $\pm$ 4,1
S1	6,4 $\pm$ 3,5	3,5 $\pm$ 1,7	6,6 $\pm$ 3,2	6,0 $\pm$ 3,0	6,2 $\pm$ 3,7	7,2 $\pm$ 4,8	5,6 $\pm$ 2,6	3,6 $\pm$ 2,2
S2	5,9 $\pm$ 3,4	1,6 $\pm$ 3,4	6,5 $\pm$ 4,6	0,7 $\pm$ 1,1	8,7 $\pm$ 8,9	1,9 $\pm$ 2,7	6,5 $\pm$ 4,5	1,8 $\pm$ 2,0
F0S0	25,3 $\pm$ 2,7	25,5 $\pm$ 7,0	24,8 $\pm$ 6,4	26,4 $\pm$ 4,3	23,2 $\pm$ 3,6	24,7 $\pm$ 4,3	22,2 $\pm$ 6,2	23,9 $\pm$ 4,4
FGS	4,5 $\pm$ 2,2	3,3 $\pm$ 1,5	5,0 $\pm$ 2,8	4,5 $\pm$ 2,4	7,2 $\pm$ 4,1	5,7 $\pm$ 3,7	4,9 $\pm$ 2,6	2,5 $\pm$ 1,1
5H	72,9 $\pm$ 6,6	75,6 $\pm$ 7,2	71,3 $\pm$ 4,6	72,9 $\pm$ 5,8	66,3 $\pm$ 9,9	71,5 $\pm$ 8,3	71,4 $\pm$ 7,1	72,9 $\pm$ 6,8

**Tabelle A9. Altersbezogener statistischer Vergleich nach Zusammenschluss der Fc N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei der Alzheimer-Krankheit.** Dargestellt sind die *p*-Werte signifikanter Unterschiede nach Anwendung statistischer Tests zur Überprüfung unterschiedlicher relativer Häufigkeiten der Glykane zwischen unter und über 75-Jährigen Kontrollprobanden (CTR) sowie Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (AD), nachdem Oligosaccharide mit (F1) oder ohne (F0) Fucose, mit (B1) oder ohne (B0) teilendem N-Acetylglucosamin, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Galaktose, mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) die Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure sowie mit Fucose und mindestens einer Galaktose und N-Acetylneuraminsäure (FGS) zusammengefasst wurden.

	CTR, <75 IgG		AD, <75 nAbs		CTR, ≥75 nAbs		AD, ≥75 IgG	
	Zuckerreste	<i>p</i> -Wert	Zuckerreste	<i>p</i> -Wert	Zuckerreste	<i>p</i> -Wert	Zuckerreste	<i>p</i> -Wert
CTR <75 nAbs	G1 S0 S1 S2	* 0,026 ** 0,008 * 0,012 ** 0,009	S0 S1	* 0,049 * 0,028	S1	* 0,030		
AD <75 IgG	-	-	-	-			-	-
CTR ≥75 IgG	-	-			G1 S0 S2	* 0,025 * 0,042 ** 0,008	-	-
AD ≥75 nAbs			G2 S1 FGS	* 0,029 * 0,032 ** 0,009	S1 FGS	* 0,045 * 0,017	F0 G0 G2 S0 S2	* 0,049 ** 0,003 ** 0,003 ** 0,007 ** 0,008



## 7.2.3 Korrelationsanalysen



**Abbildung A9. Korrelationsanalysen der nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub>-assoziierten Fc N-Glykosylierung bei Kontrollprobanden.**

Die relativen Häufigkeiten der einzelnen sowie zusammengefassten Fc N-Glykane von nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> wurden bei Kontrollprobanden hinsichtlich einer Altersabhängigkeit mithilfe der Pearson-Korrelation analysiert. Für zwei Glykane konnte ein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden. Nomenklatur: F = Fucose, A = N-Acetylglucosamin, B = teilendes GlcNAc, G = Galaktose, S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure.

**Tabelle A10. Korrelationskoeffizienten und *p*-Werte.** Dargestellt sind die Koeffizienten (*r*) und *p*-Werte der Korrelationsanalysen nach Pearson zum Test einer Altersabhängigkeit der relativen Häufigkeiten Fc-assoziiierter N-Glykane von IgG und nAbs-A $\beta$ <sub>42</sub> bei Kontrollprobanden (**CTR**) und Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Krankheit (**AD**). Dabei wurden sowohl einzelne (Nomenklatur: F = Fucose (Fuc), A = N-Acetylglucosamin (GlcNAc), B = teilendes GlcNAc (b-GlcNAc), G = Galaktose (Gal), S = Sialinsäure N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)), als auch zusammengefasste Oligosaccharide mit (F1) oder ohne (F0) Fuc, mit (B1) oder ohne (B0) b-GlcNAc, mit einer (G1), zwei (G2) oder ohne (G0) Gal sowie mit einer (S1), zwei (S2) oder ohne (S0) Neu5Ac, ohne Fuc und Neu5Ac (F0S0), mit Fuc und mindestens einer Gal und Neu5Ac (FGS) sowie die fünf häufigsten Glykane (5H) analysiert. N.a. = nicht auswertbar.

	<b>CTR, IgG</b>		<b>CTR, nAbs-A<math>\beta</math><sub>42</sub></b>		<b>AD, IgG</b>		<b>AD, nAbs-A<math>\beta</math><sub>42</sub></b>	
	<i>r</i>	<i>p</i> -Wert	<i>r</i>	<i>p</i> -Wert	<i>r</i>	<i>p</i> -Wert	<i>r</i>	<i>p</i> -Wert
<b>A2G0</b>	0,207	0,380	0,197	0,405	-0,091	0,701	0,313	0,178
<b>FA2G0</b>	0,129	0,587	-0,014	0,955	0,436	0,054	0,409	0,074
<b>A2G1</b>	0,203	0,391	0,256	0,276	0,182	0,443	0,372	0,107
<b>A2BG0</b>	-0,050	0,833	0,101	0,671	-0,001	0,997	-0,083	0,728
<b>FA2G1</b>	-0,387	0,092	-0,331	0,154	0,152	0,521	-0,368	0,110
<b>A2G2</b>	-0,180	0,448	0,109	0,647	-0,209	0,377	-0,557	0,011
<b>FA2BG0</b>	0,383	0,095	0,356	0,123	0,376	0,102	0,553	0,012
<b>A2BG1</b>	0,271	0,247	0,299	0,200	-0,159	0,503	0,150	0,528
<b>A2G1S1</b>	-0,308	0,187	0,018	0,941	-0,019	0,937	-0,186	0,432
<b>FA2G2</b>	-0,249	0,290	-0,247	0,293	0,229	0,332	-0,509	0,022
<b>FA2BG1</b>	0,172	0,469	0,018	0,940	0,213	0,368	0,226	0,338
<b>A2BG2</b>	-0,083	0,728	0,213	0,367	-0,012	0,960	-0,186	0,432
<b>FA2G1S1</b>	-0,371	0,108	0,341	0,141	-0,012	0,959	-0,550	0,012
<b>A2G2S1</b>	-0,047	0,844	0,600	0,005	-0,126	0,595	-0,294	0,208
<b>A2BG1S1</b>	-0,272	0,247	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>FA2BG2</b>	-0,021	0,929	-0,201	0,395	0,333	0,151	-0,276	0,238
<b>FA2G2S1</b>	-0,033	0,891	0,177	0,456	-0,194	0,413	-0,620	0,004
<b>FA2BG1S1</b>	-0,261	0,266	0,325	0,163	0,308	0,187	0,165	0,486
<b>A2BG2S1</b>	-0,162	0,494	n.a.	n.a.	-0,464	0,039	-0,071	0,767
<b>A2G2S2</b>	0,054	0,821	0,601	0,005	-0,279	0,234	0,137	0,565
<b>FA2BG2S1</b>	-0,117	0,624	n.a.	n.a.	-0,212	0,369	0,071	0,767
<b>FA2G2S2</b>	-0,118	0,620	n.a.	n.a.	-0,367	0,111	0,180	0,447

<b>A2BG2S2</b>	-0,241	0,305	-0,186	0,433	-0,752	< 0,001	0,101	0,672
<b>FA2BG2S2</b>	0,073	0,760	-0,205	0,386	-0,723	< 0,001	0,012	0,961
<b>F0</b>	0,105	0,660	0,347	0,134	-0,630	0,003	0,029	0,903
<b>F1</b>	-0,105	0,660	-0,347	0,134	0,630	0,003	-0,029	0,903
<b>B0</b>	-0,134	0,574	-0,106	0,658	0,589	0,006	-0,272	0,247
<b>B1</b>	0,134	0,574	0,106	0,658	-0,589	0,006	0,272	0,247
<b>G0</b>	0,217	0,358	0,056	0,815	0,398	0,083	0,594	0,006
<b>G1</b>	-0,360	0,119	-0,205	0,386	0,293	0,210	-0,376	0,103
<b>G2</b>	-0,103	0,667	0,016	0,948	-0,492	0,028	-0,591	0,006
<b>S0</b>	0,081	0,733	-0,305	0,191	0,648	0,002	0,352	0,128
<b>S1</b>	-0,187	0,430	0,412	0,071	-0,292	0,212	-0,520	0,019
<b>S2</b>	0,017	0,943	-0,045	0,850	-0,698	0,001	0,147	0,537
<b>F0S0</b>	0,117	0,622	0,303	0,195	-0,053	0,824	0,036	0,882
<b>FGS</b>	-0,148	0,534	0,183	0,440	-0,553	0,011	-0,473	0,035
<b>5H</b>	-0,098	0,680	-0,154	0,516	0,500	0,025	0,027	0,912

## 7.2.4 Regressionswerte Patientenstudie

**Abbildung A10. Nach der Regressionsformel berechnete Werte zur Unterscheidung von Kontrollprobanden und Alzheimer-Patienten.** Dargestellt sind für jeden Kontrollprobanden und Alzheimer-Patienten die relativen Häufigkeiten der für die Regressionsformel erforderlichen Glykane, das Alter sowie der berechnete Regressionswert.

Patienten #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>Kontrollprobanden</b>																				
A2G0	0,013	0,027	0,000	0,038	0,000	0,028	0,023	0,038	0,026	0,024	0,022	0,031	0,044	0,031	0,027	0,000	0,000	0,013	0,018	0,000
FA2G0	0,261	0,305	0,336	0,199	0,186	0,205	0,192	0,265	0,283	0,203	0,186	0,244	0,280	0,314	0,246	0,167	0,242	0,347	0,246	0,171
A2BG0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,027	0,000	0,031	0,009	0,011	0,015	0,012	0,008	0,019	0,017	0,000	0,026	0,013	0,012	0,000
FA2G1	0,360	0,248	0,278	0,254	0,222	0,205	0,266	0,176	0,271	0,257	0,248	0,206	0,249	0,175	0,226	0,232	0,203	0,171	0,243	0,244
A2G2	0,035	0,072	0,074	0,096	0,090	0,080	0,090	0,076	0,096	0,100	0,113	0,094	0,088	0,074	0,077	0,086	0,068	0,063	0,103	0,103
A2BG1	0,006	0,025	0,000	0,025	0,031	0,037	0,027	0,037	0,014	0,026	0,034	0,032	0,016	0,036	0,024	0,000	0,027	0,035	0,026	0,024
FA2G2	0,137	0,051	0,043	0,069	0,062	0,064	0,089	0,045	0,074	0,103	0,093	0,083	0,083	0,036	0,057	0,083	0,035	0,030	0,059	0,094
A2BG2	0,000	0,011	0,000	0,015	0,022	0,020	0,017	0,017	0,012	0,016	0,023	0,023	0,009	0,017	0,014	0,025	0,000	0,011	0,019	0,020
FA2G1S1	0,008	0,007	0,000	0,011	0,000	0,017	0,000	0,000	0,008	0,012	0,014	0,014	0,007	0,012	0,011	0,024	0,000	0,013	0,018	0,026
A2G2S1	0,004	0,009	0,000	0,025	0,000	0,021	0,000	0,014	0,000	0,010	0,011	0,013	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,007	0,012	0,017
FA2BG2	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000
A2G2S2	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,014	0,009	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A2BG2S2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,046	0,000	0,000	0,000
Alter	57	75	63	90	52	85	79	72	69	71	61	65	59	79	56	75	68	84	76	76
Regressionswert	0,256	0,007	0,388	0,005	0,129	0,244	0,316	0,133	0,180	0,000	0,037	0,127	0,210	0,471	0,162	0,259	0,181	0,396	0,521	0,000
<b>Alzheimer-Patienten</b>																				
A2G0	0,024	0,022	0,000	0,022	0,029	0,026	0,050	0,030	0,019	0,045	0,000	0,039	0,023	0,021	0,000	0,000	0,018	0,028	0,013	0,000
FA2G0	0,327	0,347	0,217	0,305	0,219	0,310	0,329	0,227	0,283	0,231	0,183	0,262	0,307	0,384	0,210	0,217	0,246	0,225	0,193	0,113
A2BG0	0,017	0,012	0,032	0,019	0,016	0,015	0,000	0,013	0,003	0,031	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000	0,007	0,000
FA2G1	0,175	0,226	0,166	0,169	0,272	0,233	0,176	0,204	0,338	0,232	0,215	0,216	0,260	0,274	0,195	0,162	0,229	0,288	0,256	0,219
A2G2	0,053	0,066	0,073	0,075	0,100	0,073	0,068	0,094	0,073	0,074	0,067	0,061	0,062	0,044	0,067	0,054	0,073	0,096	0,109	0,094
A2BG1	0,033	0,025	0,030	0,028	0,024	0,028	0,021	0,023	0,015	0,027	0,023	0,033	0,022	0,017	0,029	0,033	0,029	0,023	0,021	0,035
FA2G2	0,028	0,041	0,047	0,048	0,076	0,055	0,027	0,059	0,080	0,071	0,090	0,047	0,056	0,039	0,043	0,031	0,064	0,076	0,075	0,106
A2BG2	0,018	0,009	0,000	0,011	0,020	0,014	0,011	0,016	0,008	0,000	0,000	0,005	0,012	0,006	0,000	0,000	0,016	0,008	0,019	0,000
FA2G1S1	0,011	0,008	0,024	0,013	0,010	0,009	0,009	0,019	0,002	0,000	0,000	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,029	0,041
A2G2S1	0,007	0,000	0,000	0,016	0,007	0,005	0,022	0,018	0,002	0,000	0,000	0,017	0,011	0,002	0,028	0,026	0,014	0,003	0,021	0,027
FA2BG2	0,007	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,002	0,000	0,000	0,005	0,000	0,009	0,000
A2G2S2	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,034	0,006	0,000	0,000	0,000	0,018	0,008	0,002	0,031	0,047	0,009	0,002	0,009	0,000
A2BG2S2	0,015	0,010	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
Alter	85	81	71	74	75	78	83	72	55	81	87	82	74	83	75	79	65	80	56	60
Regressionswert	0,794	0,608	1,000	0,571	0,953	0,256	0,914	0,556	0,862	1,000	0,806	0,999	0,866	0,900	0,779	1,000	0,812	0,701	0,978	0,738

## 7.2 Dokumente der Patientenstudie



Klinik für Neurologie

Prof. Dr. R. Dodel  
Baldingerstraße  
35043 Marburg  
Tel.: 06421/58 65190

### **Informationsblatt für Patienten**

#### **„Natürlich vorkommende Autoantikörper im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen: Grundlage neuer therapeutischer und diagnostischer Ansätze?“**

**Sehr geehrte Damen und Herren,**

wir möchten Sie bitten, an einer Studie über die Parkinson- und Alzheimer-Erkrankung teilzunehmen. Nachstehend werden wir Ihnen Einzelheiten zu dieser Studie erläutern. Damit Sie an unserer Studie teilnehmen können, benötigen wir Ihre schriftliche Einverständniserklärung. Dafür muss die beiliegende Einverständniserklärung unterschrieben werden. Zuvor sollten jedoch sämtliche Fragen, die Sie zu unserer Studie haben, zu Ihrer Zufriedenheit beantwortet sein.

Der vorliegende Informationstext soll dazu dienen, Ihnen den Hintergrund der Studie sowie den Ablauf zu erläutern. Anschließend wird ein Prüfarzt das Aufklärungsgespräch mit Ihnen führen. Bitte zögern Sie nicht, alle noch offenen Fragen anzusprechen. Danach erhalten Sie ausreichend Bedenkzeit, um über Ihre Studienteilnahme zu entscheiden.

Bitte nehmen Sie sich die Zeit, dieses Informationsblatt aufmerksam zu lesen und fragen Sie nach, wenn Ihnen etwas unklar

ist. Nehmen Sie sich Zeit, mit Ihrem behandelnden Arzt oder Ihren Angehörigen zu sprechen. Bitte entscheiden Sie dann erst über eine Teilnahme.

### **Um was für eine Studie handelt es sich?**

Wir möchten mithilfe von Parkinson- und Alzheimer-Patienten sowie Patienten ohne eine der beiden oder verwandten Erkrankungen eine Pilotstudie zur Untersuchung von so genannten „natürlich vorkommenden Autoantikörpern“ durchführen. Eine bestimmte Gruppe dieser speziellen Antikörper steht im Zusammenhang mit der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit und könnte in Zukunft einen wirksamen, therapeutischen Ansatz liefern. Für unsere Untersuchungen benötigen wir von jedem Teilnehmer 15 ml Blut.

**Dies ist keine Medikamenten-Studie.** Wir möchten nicht, dass Sie andere Medikamente oder Medikamente zusätzlich einnehmen, die Ihnen Ihr behandelnder Arzt nicht verschrieben hat.

### **Ziel der Studie**

Für die Entstehung der Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung werden Verklumpungen von bestimmten Eiweißen im Gehirn verantwortlich gemacht. Durch diese so genannten Proteinaggregate kommt es zum Absterben von Nervenzellen und weiteren pathologischen Veränderungen, welche typisch für die Erkrankungen sind. Deshalb stellt ein großes Ziel der aktuellen Alzheimer- und Parkinson-Forschung die Entdeckung eines Mechanismus dar, welcher die toxischen Proteinaggregate beseitigt. Hier könnten Antikörper von großem Nutzen sein.

Antikörper werden im menschlichen Körper in großer Menge zum Schutz vor Bakterien, Viren und anderen schädlichen Organismen und Strukturen gebildet.

Eine besondere Form von Antikörpern repräsentieren die so genannten „natürlich vorkommenden Autoantikörper“. Diese werden bei allen Menschen zeitlebens vom Immunsystem hergestellt und schützen vor veränderten, körpereigenen Strukturen. Unter diesen natürlich vorkommenden Autoantikörpern existieren auch solche, die die toxischen Proteinaggregate bei der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit erkennen, beseitigen und somit einen potentiell schützenden Mechanismus darstellen können. Daher fragen wir uns als Forscher, ob die natürlich vorkommenden Autoantikörper – und somit der schützende Mechanismus – von Alzheimer- und Parkinson-Kranken verändert sind.

Im Zuge unserer Studie möchten wir ein wichtiges Merkmal – die so genannte Glykosylierung – dieser Antikörper auf Veränderungen überprüfen. Hierbei handelt es sich um kleine Zuckerketten, welche mit den Antikörpern verknüpft sind und die unter anderem die Wirksamkeit der Beseitigung der toxischen Proteinaggregate bestimmen. Sollten sich bei Alzheimer- und Parkinson-Patienten unterschiedliche Zuckerketten der Antikörper zeigen, könnte dies neue therapeutische Ansätze für beide Erkrankungen aufzeigen.

### **Ablauf der Studie**

Wenn Sie uns Ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie gegeben haben, möchten wir Sie bitten, uns einige Informationen über sich selbst zu geben (Name, Geburtsort und -tag). Anschließend werden Ihnen Fragen zu Ihrer Erkrankung und Medikation gestellt und ein kurzer Test zur Überprüfung Ihrer zeitlichen und räumlichen Orientierung durchgeführt. Dies dient der Feststellung, ob Sie als Studienteilnehmer in Frage kommen.

Wenn Sie als Studienteilnehmer geeignet sind, wird ein approbierter Arzt Ihnen einmalig eine Vollblutspende von ca. 15 ml abnehmen (meist eine Vene im Bereich der Ellenbeuge). Dabei kann es in seltenen Fällen zu lokalen Hämatomen (Blutergüssen) kommen, die im Normalfall nach wenigen Tagen abgeklungen sein sollten.

**Abbruch der Studie**

Ihre Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahme beenden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile entstehen.

**Verwendung und Speicherung von Daten**

Ihre Daten werden in elektronischer Form pseudonymisiert gespeichert, d.h. für die Eingabe Ihrer Studiendaten in den Computer wird ein Code verwendet. Dieses Verfahren, bei dem persönliche Kenndaten durch eine Ziffern- und/oder Buchstabenkombination ersetzt werden, nennt man Pseudonymisierung. Da es aber für den Projektleiter möglich sein muss, die Patienten zu identifizieren, wird eine Schlüsselliste angelegt, auf der Ihr Name und der für Sie zufällig ausgewählte Code stehen. Die Schlüsselliste, d.h. welcher Code welchem Patienten zugeordnet ist, wird mit den Dokumentationsbögen im entsprechenden Zentrum verwahrt. 12 Monate nach Auswertung der Studie wird die Schlüsselliste vernichtet.

Die Zugangsberechtigung zu den im Rahmen der Studie erhobenen Daten liegt ausschließlich bei Mitarbeitern des Projektes; sie werden nicht an Dritte weitergegeben. Nach Beendigung der Datenerhebung werden alle Angaben statistisch ausgewertet und die Ergebnisse ohne Nennung persönlicher Daten veröffentlicht.

**Wir danken Ihnen für Ihr Interesse. Falls Sie Fragen haben sollten, wenden Sie sich bitte zuerst an Ihren behandelnden Arzt. Darüber hinaus stehen wir Ihnen gerne telefonisch unter 06421-5865606 zur Verfügung.**

---

Dr. M. Balzer-Geldsetzer

---

Prof. Dr. R. Dodel





Klinik für Neurologie

Prof. Dr. R. Dodel  
Baldingerstraße  
35043 Marburg  
Tel.: 06421/58 65190

## **„Natürlich vorkommende Autoantikörper im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen: Grundlage neuer therapeutischer und diagnostischer Ansätze?“**

**Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten**

---

**„Natürlich vorkommende Autoantikörper im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen: Grundlage neuer  
therapeutischer und diagnostischer Ansätze?“**

Ich, (Name des Patienten in Blockschrift) \_\_\_\_\_,  
habe die beigefügte Patienteninformation gelesen und verstehe den Ablauf und die  
Bedeutung der Studie, an der teilzunehmen man mich gebeten hat. Die Notwendigkeit  
einer ausführlichen Besprechung hat man mir erklärt. Alle Fragen zu dieser  
vorgesehenen Studie wurden von Herrn/Frau Dr. med.  
\_\_\_\_\_ zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich hatte genügend Zeit für meine Entscheidung und bin bereit, an der oben genannten  
Studie teilzunehmen. Ich bin mit den im Rahmen der Studie erfolgenden  
Aufzeichnungen von Krankheitsdaten und ihrer Weitergabe entsprechend der  
Patienteninformation einverstanden.

Ich verstehe, dass ich jederzeit meine Teilnahme an dieser Studie beenden kann, ohne  
meine Entscheidung weiter erklären oder begründen zu müssen, und ohne dass diese  
Entscheidung meine weitere Behandlung beeinflussen wird. Ich bin damit  
einverstanden, dass alle Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Untersuchung für eine  
Veröffentlichung in der medizinisch-wissenschaftlichen Literatur freigegeben werden  
können. Eine Ausfertigung des Informationsblattes und der Einwilligungserklärung  
habe ich erhalten.

---

Datum, Ort

---

Datum, Ort

---

Unterschrift des Patienten

---

Unterschrift des aufklärenden Arztes



Klinik für Neurologie

Prof. Dr. R. Dodel  
Baldingerstraße  
35043 Marburg  
Tel.: 06421/58 65190

**„Natürlich vorkommende Autoantikörper im Rahmen  
neurodegenerativer Erkrankungen: Grundlage neuer  
therapeutischer und diagnostischer Ansätze?“**

**Dokumentationsbogen zum Ein- oder Ausschluss von  
Alzheimer Patienten**

Auszufüllen vom untersuchenden Arzt.

Pseudonym Patient/Patientin

--	--	--	--	--	--

Name des Patienten: \_\_\_\_\_

Geb.dat.: \_\_\_\_\_

Pseudonym: \_\_\_\_\_ (Eintrag Schlüsselliste)

### Ein- und Ausschlusskriterien

	Ja	Nein
Idiopathische Alzheimer-Krankheit nach NINCDS-ARDA (wahrscheinlich)	X	
Andere Ursachen der Demenz (Creutzfeld-Jakob-Erkrankung, frontotemporale Demenz, etc.)		X
Passive Impfung in den letzten 4 Monaten		X
Medikamentöse Behandlung mit Immunglobulinen in den letzten 4 Monaten		X
Erkrankung des blutbildenden Systems (z.B. Leukämie)		X
MMSE-Score	SOLL: <25	

Auszufüllen vom untersuchenden Arzt.

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der nachfolgenden Angaben mit meiner Unterschrift.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift



Klinik für Neurologie

Prof. Dr. R. Dodel  
Baldingerstraße  
35043 Marburg  
Tel.: 06421/58 65190

**„Natürlich vorkommende Autoantikörper im Rahmen  
neurodegenerativer Erkrankungen: Grundlage neuer  
therapeutischer und diagnostischer Ansätze?“**

**Dokumentationsbogen zum Ein- oder Ausschluss von  
Kontroll-Patienten**

**Auszufüllen vom untersuchenden Arzt.**

Pseudonym Patient/Patientin

--	--	--	--	--	--

Name des Probanden: \_\_\_\_\_

Geb.dat.: \_\_\_\_\_

Pseudonym: \_\_\_\_\_ (Eintrag Schlüsselliste)

### Ein- und Ausschlusskriterien

Diagnose		
	Ja	Nein
Diagnostizierte Alzheimer-Krankheit		X
Passive Impfung in den letzten 4 Monaten		X
Medikamentöse Behandlung mit Immunglobulinen in den letzten 4 Monaten		X
Erkrankung des blutbildenden Systems (z.B. Leukämie)		X
MMSE-Score	SOLL: $\geq 25$	

Auszufüllen vom aufklärenden Arzt.

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der nachfolgenden Angaben mit meiner Unterschrift.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## Mini-Mental Status Examination – MMSE

### 1. Orientierung (jeweils 1 Punkt für jede richtige Antwort)

- 1. Datum ☐
- 2. Wochentag ☐
- 3. Monat ☐
- 4. Jahr ☐
- 5. Jahreszeit ☐
- 6. Bundesland ☐
- 7. Land ☐
- 8. Stadt ☐
- 9. Klinik / Praxis / Altersheim ☐
- 10. Stockwerk ☐

### 2. Merkfähigkeit (VL nennt nebenstehende Begriffe und fordert Pb anschließend zur Reproduktion auf; es wird 1 Punkt für jede richtige Antwort vergeben. Bitte Pb daran erinnern, sich die Worte zu merken.)

- 11. Auto ☐
- 12. Blume ☐
- 13. Kerze ☐

### 3. Aufmerksamkeit und Rechenfähigkeit (In 7-er- Schritten, beginnend bei 100, rückwärts zählen; Abbruch bei 5 Antworten; 1 Punkt / richtige Antwort. Bei falscher Antwort richtiges Ergebnis nennen. Von korrektem Ergebnis aus folgt die nächste Subtraktion.)

- 14. 93 ☐
- 15. 86 ☐
- 16. 79 ☐
- 17. 72 ☐
- 18. 65 ☐

### 4. Erinnerungsfähigkeit (Den Pb nach den 2. genannten Wörtern Fragen; 1 Punkt / richtige Nennung)

- 19. Auto ☐
- 20. Blume ☐
- 21. Kerze ☐

### 5. Sprache (1 Punkt für jede korrekte Antwort/ Handlung)

- 22. Armbanduhr benennen ☐
- 23. Bleistift benennen ☐
- 24. Nachsprechen des Satzes:  
„Sie leiht ihm kein Geld mehr.“ ☐
- 25. Blatt Papier in die rechte Hand ☐
- 26. – in der Mitte falten ☐
- 27. – auf den Tisch legen ☐
- 28. Anweisung vorlesen und  
befolgen ☐
- 29. Schreiben eines vollständigen  
Satzes ☐
- 30. Nachzeichnen ☐

Gesamt \_\_\_\_\_

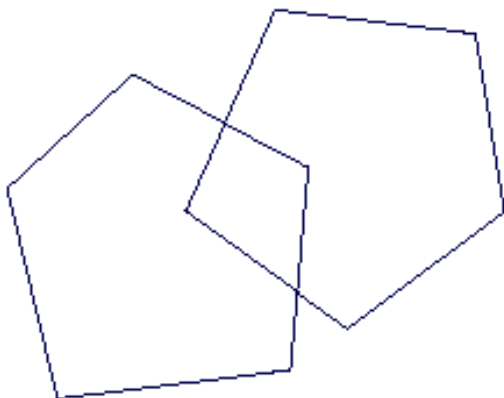
**Bitte schließen Sie die Augen!**

**Bitte schreiben Sie einen Satz!**

---

---

---





### 7.3 Publikationen

- Leitner, M.G., Thallmair, V., Wilke, B.U., Neubert, V., Kronimus, Y., Halaszovich, C.R., Oliver, D., 2019. The N-terminal homology (ENTH) domain of Epsin 1 is a sensitive reporter of physiological PI(4,5)P2 dynamics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1864(3): 433-442.
- Kronimus, Y., Dodel, R., Galuska, S.P., Neumann, S., 2019. IgG Fc N-glycosylation: Alterations in neurologic diseases and potential therapeutic target? *J Autoimmun*, 96: 14-23.
- Kronimus, Y., Dodel, R., Neumann, S., 2018. A Quantitative View on Naturally Occurring Autoantibodies in Neurodegenerative Diseases. *J Neurol Neuromedicine*, 3(4): 5-11.
- Albus, A., Gold, M., Bach, J.P., Burg-Roderfeld, M., Jordens, M., Kirchhein, Y., Kronimus, Y., Mengel, D., Zerr, I., Dodel, R., 2018. Extending the functional characteristics of naturally occurring autoantibodies against beta-Amyloid, Prion Protein and alpha-Synuclein. *PLoS One*, 13(8): e0202954.
- Kuhn, I., Rogosch, T., Schindler, T.I., Tackenberg, B., Zemlin, M., Maier, R.F., Dodel, R., Kronimus, Y., 2018. Serum titers of autoantibodies against alpha-synuclein and Tau in child- and adulthood. *J Neuroimmunol*, 315: 33-39.
- Kronimus, Y., Albus, A., Balzer-Geldsetzer, M., Straub, S., Semler, E., Otto, M., Klotsche, J., Dodel, R., Consortium, L., Mengel, D., 2016. Naturally Occurring Autoantibodies against Tau Protein Are Reduced in Parkinson's Disease Dementia. *PLoS One*, 11(11): e0164953.
- Wilke, B.U., Lindner, M., Greifenberg, L., Albus, A., Kronimus, Y., Bunemann, M., Leitner, M.G., Oliver, D., 2014. Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. *Nat Commun*, 5: 5540.

## 7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrer/-innen waren die Damen und Herren der ...

... Technischen Universität Kaiserslautern:

Arendholz, Wolf-Rüdiger	Hahn, Matthias	Siegesmund, Maria
Becker, Holger	Henrich, Bernhard	Stockis, Jean-Pierre
Bergsträßer, Uwe	Herrmann, Johannes	Stoeck, Thorsten
Büdel, Burkhard	Kins, Stefan	Sun, Yu
Cullum, John	Krüger, Hans-Jörg	Thyssen, Anne
Deitmer, Joachim	Lach, Stefan	Trommer, Wolfgang
Franke, Jürgen	Leitz, Thomas	Wirth, Rainer
Friauf, Eckhard	Neuhaus, Ekkehard	Zingler, Nora
Ghose, Tandra	Schinauer, Thomas	
Hagenbeck, Regine	Schroda, Michael	

... Philipps-Universität Marburg:

Bertoune, Mirjam	Jansen, Andreas
Buchholz, Malte	Oberwinkler, Johannes
Bünemann, Moritz	Oliver, Dominik
Decher, Niels	Plant, Tim
Dempfle, Astrid	Schäfer, Martin
Dodel, Richard	Schütz, Burkhard
Greene, Brandon	Weihe, Eberhard
Hänze, Jörg	

## 7.5 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Richard Dodel für die Möglichkeit bedanken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe und mithilfe seiner Betreuung die Doktorarbeit anfertigen konnte. In besonderem Maße danke ich Ihm für das Voranbringen meiner wissenschaftlichen Karriere, insbesondere durch die stete Unterstützung bei der Anfertigung von Publikationen.

Dr. Sascha Neumann gebührt mein Dank für seine Hilfe und seinen Optimismus bei der experimentellen Planung und Problembewältigung. Wenn auch nur für eine überschaubare Zeit, war es schön, von einem erfahrenen Wissenschaftler lernen zu können.

Ich danke meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Günter Lochnit, PD Dr. Sebastian Galuska, Prof. Dr. Barbara Sitek, Dr. Dominik Megger, Prof. Dr. Dirk Hermann, Janine Gronewold, Dr. Denise Zwanziger, PD Dr. Marc Seifert, Dr. Bettina Budeus, Dr. Mike Hasenberg, Bernd Walkenfort und Prof. Dr. Dieter Willbold für die experimentelle und unkomplizierte Zusammenarbeit, ohne die der erfolgreiche Abschluss meiner Dissertation nicht realisierbar gewesen wäre.

Bedanken möchte ich mich bei Susanne, Tine, Rosi, Michael, Jotti, Kerstin und all den anderen „Hinterbliebenen“ in Marburg. Das unglaublich tolle Arbeitsklima über die AG-Grenzen hinaus sucht seines Gleichen und machte den Laborumzug nach Essen umso schwerer.

Vielen Dank an Alex und Natascha, meine Gefährten der ersten Stunde auf dem teils steinigen Weg zum akademischen Gipfel. Die Zeit war für uns alle nicht immer einfach. Umso wichtiger, dass wir uns gegenseitig beistehen und helfen konnten und immer ein offenes Ohr für den jeweils anderen hatten. Ihr seid zu echten Freunden geworden und ich hoffe, wir verlieren uns nicht aus den Augen.

Zu guter Letzt möchte ich meinen größten Dank an meine Eltern, meine Schwester Kathrin und meine Freundin Kerstin aussprechen. Ihr wart in nur allen erdenklichen Belangen stets die maximale Unterstützung meines Vorhabens, weshalb ich diese Arbeit Euch widme! Ich wäre nie dort, wo ich bin, gäbe es euch nicht. Vor allem dir Kerstin, muss ich zutiefst Danke sagen! Dass du dich mir zu Liebe so oft zurückgenommen hast, meinen Weg von Kaiserslautern über Marburg nach Essen mitgegangen bist, mich in allen Dingen bestärkst und mir stets den Rücken frei hältst, ist alles andere als selbstverständlich. Du bist meine Stütze und hierfür kann ich dir gar nicht oft genug danken!